

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



“TRATAMIENTO FISICOQUÍMICO DE EFLUENTE AVÍCOLA Y SUBSECUENTE USO PARA CULTIVO DE MICROALGAS *CHLORELLA VULGARIS* EN BIORREACTORES OPERADO EN MODO CONTINUO”

Tesis presentada por el bachiller:

García Bustos, Kiara Alejandra

Para optar el Título Profesional de

Ingeniera Biotecnóloga

Asesor:

PhD. Terán Hilares, Ruly

Co-asesor:

PhD. Cárdenas García, Jaime

Arequipa – Perú

2021

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
INGENIERIA BIOTECNOLOGICA
DICTAMEN DE APROBACIÓN DE BORRADOR
TITULACIÓN CON TESIS

Arequipa, 31 de Agosto del 2021

Dictamen: 003900-C-EPIB-2021

Visto el Borrador del expediente 003900, presentado por:

2015100862 - GARCIA BUSTOS KIARA ALEJANDRA

Titulado:

**TRATAMIENTO FISICOQUÍMICO DE EFLUENTE AVÍCOLA Y SUBSECUENTE USO PARA CULTIVO
DE MICROALGAS CHLORELLA VULGARIS EN BIORREACTORES OPERADO EN MODO CONTINUO**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

2780 - VALDIVIA CARPIO WILLY ANIBAL
DICTAMINADOR

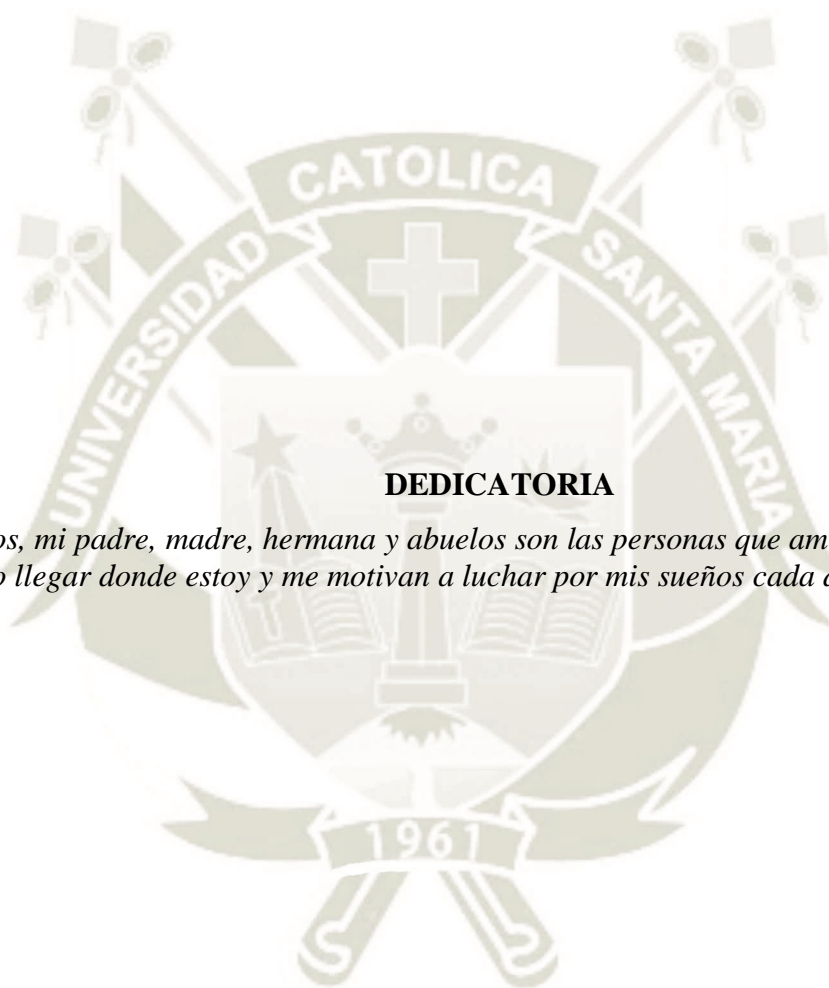


2394 - CORDOVA BARRIOS CINTHIA CAROL
DICTAMINADOR



3043 - PAREDES ZAVALA JOSHELYN MARIANGELA
DICTAMINADOR



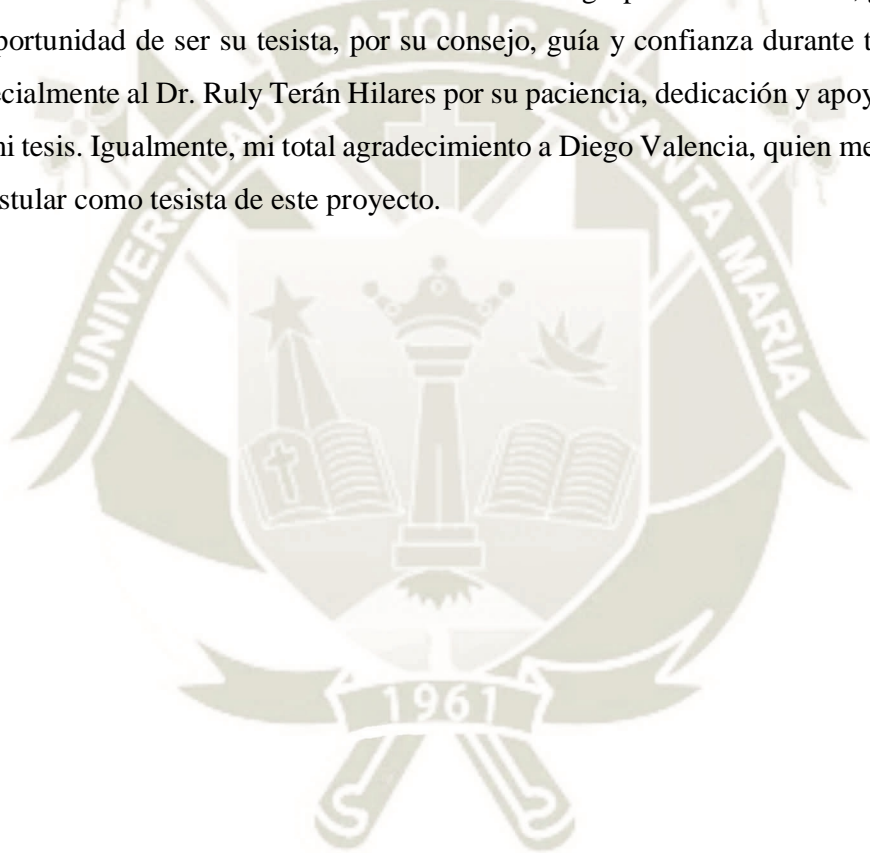


DEDICATORIA

A Dios, mi padre, madre, hermana y abuelos son las personas que amo, las que me han hecho llegar donde estoy y me motivan a luchar por mis sueños cada día.

AGRADECIMIENTOS

Mi completo agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) y al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) que brindó el financiamiento para el desarrollo del Proyecto 06-2019-FONDECYT-BM-INC.INV “Uso de la nanotecnología en el desarrollo de membranas para desalinización, purificación de agua, e industria alimentaria”, de esta forma, permitiéndome la realización de mi tesis. A todo el grupo de MEMTECH, gracias por darme la oportunidad de ser su tesista, por su consejo, guía y confianza durante todo este proceso, especialmente al Dr. Ruly Terán Hilaes por su paciencia, dedicación y apoyo en el desarrollo de mi tesis. Igualmente, mi total agradecimiento a Diego Valencia, quien me informó y animó a postular como tesista de este proyecto.



*El contenido de la presente tesis fue previamente publicado: R. Terán Hilaes., Kiara A. García Bustos., Fabio P. Sánchez Vera., Gilberto J. Colina Andrade., David A. Pacheco Tanaka. *Acid precipitation followed by microalgae (Chlorella vulgaris) cultivation as a new approach for poultry slaughterhouse wastewater treatment*. Bioresource Technology. 335(2021), 125284.



ÍNDICE

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	4
DEFINICIÓN OPERACIONAL Y CONCEPTUAL DE LAS VARIABLES	5
OBJETIVOS.....	6
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos.....	6
CAPÍTULO I.....	7
1. MARCO TEÓRICO.....	7
1.1 Efluentes.....	7
1.1.1 Efluentes avícolas.....	7
1.2 Tratamientos de aguas residuales	9
1.2.1 Tratamiento Primario	9
1.2.2 Tratamiento Secundario	9
1.2.3 Tratamiento Físicoquímico	11
1.3 Precipitación ácida en efluentes industriales.....	13
1.4 Tratamiento de efluentes industriales con microalgas.....	14
1.4.1 Simbiosis de microalgas y bacterias en el tratamiento de aguas residuales.	16
1.5 Biología de las microalgas	18

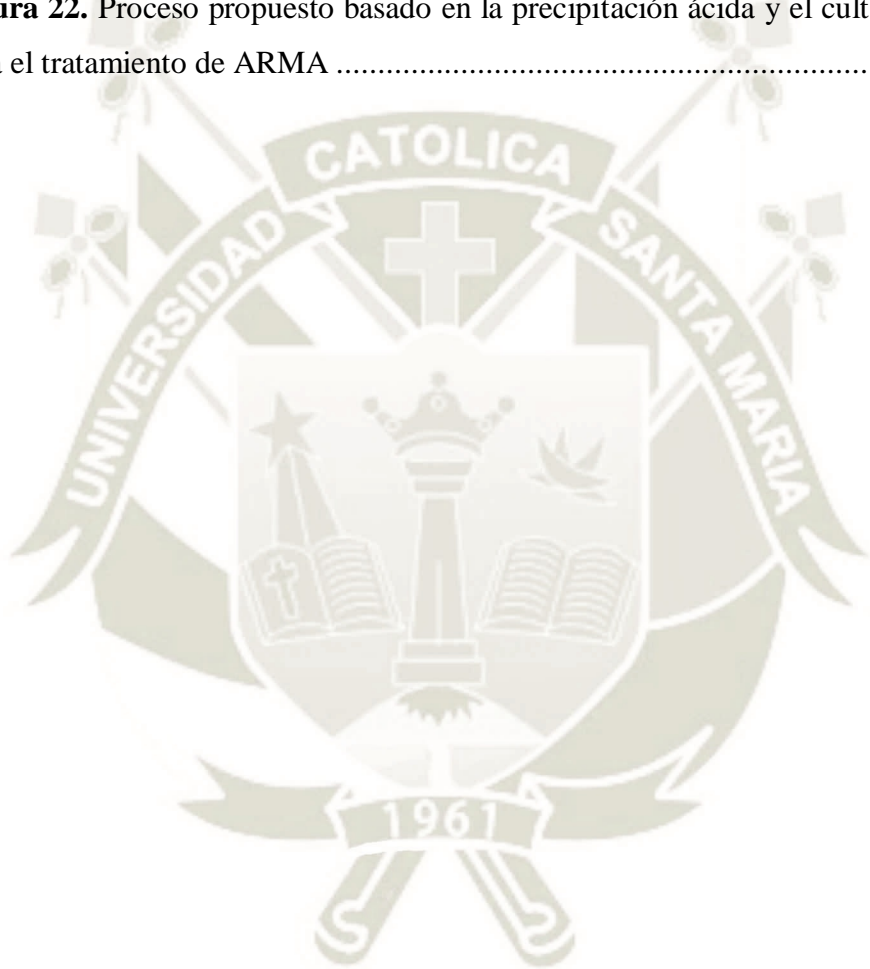
1.6	Cultivo de microalgas	19
1.6.1	Parámetros para considerar en un sistema de cultivo de microalgas.....	19
1.6.2	Fases de crecimiento de las microalgas	23
1.6.3	Principales tipos de cultivo de microalgas	24
1.6.4	Sistemas de cultivo de microalgas	24
1.6.5	Fotobioreactores tubulares verticales	26
1.6.6	Biorrefinería de la microalga.....	28
1.7	<i>Chlorella vulgaris</i>	31
1.7.1	Morfología.....	31
1.7.2	Reproducción.....	32
1.7.3	Composición química	33
1.8	Parámetros fisicoquímicos de calidad de las aguas	34
1.8.1	DQO.....	34
1.8.2	DBO	34
1.8.3	Biodegradabilidad DBO/DQO	35
1.8.4	Sólidos.....	35
1.8.5	pH	36
1.8.6	Nitrógeno	36
1.8.7	Fósforo	37
1.8.8	Aceites y grasa.....	37
1.8.9	Turbidez	37
CAPÍTULO II.....		38
2.	MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	38
2.1	Lugar de ejecución.....	38
2.2	Materiales	38
2.2.1	Muestras y/o unidades biológicas.....	38
2.2.2	Material de laboratorio.....	38
2.2.3	Insumos y reactivos químicos	38
2.2.4	Equipos e instrumentación.	39
2.3	Metodología.....	41
2.3.1	Obtención y cultivo de la microalga " <i>Chlorella vulgaris</i> "	41

2.3.2	Caracterización de aguas residuales de matadero de aves de corral (ARMA)	42
2.3.3	Precipitación ácida de ARMA.....	43
2.3.4	Cultivo de microalgas a diferentes pH y dilución de TARMA.....	43
2.3.5	Cultivo de microalgas en TARMA - proceso por lotes	44
2.3.6	Cultivo de microalgas en TARMA - proceso continuo	44
2.3.7	Métodos analíticos	46
2.3.8	Métodos estadísticos	49
CAPÍTULO III		50
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
3.1	Propiedades fisicoquímicas de ARMA	50
3.2	Precipitación ácida de ARMA.....	51
3.3	Cultivo de microalgas a diferentes diluciones de TARMA	55
3.4	TARMA para cultivo de microalgas en lote seguido de proceso continuo	56
CONCLUSIONES		62
RECOMENDACIONES		63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		64
ANEXOS.....		87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del cultivo de microalgas para el tratamiento de aguas residuales..	15
Figura 2. Curva típica de crecimiento de un cultivo de microalgas.	23
Figura 3. Vista lateral de un estanque de alta tasa de microalgas con adición de CO ₂ ..	25
Figura 4. Esquema de un fotobiorreactor de columna de burbujas.....	27
Figura 5. Esquema de un fotobiorreactor de transporte aéreo (a) bucle interno, (b) bucle interno concéntrico, (c) bucle externo.....	28
Figura 6. Biorefinería de la biomasa microalgal utilizada en el tratamiento de aguas residuales.	29
Figura 7. Esquema de la estructura morfológica de “ <i>C. vulgaris</i> ” ..	32
Figura 8. Fotografía del fotobiorreactor de tubo concéntrico de bucle interno.....	41
Figura 9. Recta de calibración de la microalga “ <i>Chlorella vulgaris</i> ” ..	42
Figura 10. Representación esquemática del sistema continuo usado en el cultivo de “ <i>Chlorella vulgaris</i> ” en ARMA.....	45
Figura 11. Fotografía del sistema de microfiltración implementado.....	46
Figura 12. Recta de calibración de la demanda química de oxígeno.....	47
Figura 13. Resultados de la precipitación ácida (a) Remoción de DQO a diferentes condiciones de pH. (b) Fotografía de la prueba de precipitación ácida a diferentes pH (2-7).....	52
Figura 14. (a) Fotografía de la prueba de precipitación ácida de ARMA en probetas de 500 mL a pH 4,5 y 6. (b) Fotografía del sobrenadante obtenido a pH 4, 5 y 6.....	52
Figura 15. Composición proximal del precipitado.	53
Figura 16. Fotografía de los resultados obtenidos de la prueba de control microbiológico donde se muestra la viabilidad de microorganismos cultivados en Agar PDA a 35°C. ...	54
Figura 17. Fotografías del crecimiento de las microalgas en TARMA (a) pH 4 (b) pH 5 y (c) pH 6 después de 48 h.	55
Figura 18. Perfil del desempeño de la DQO, pH y contenido de biomasa durante el tratamiento de TARMA en modo batch y continuo utilizando un fotobiorreactor tubular concéntrico tipo airlift.	57

Figura 19. Cultivo de microalga utilizando TARMA (a) por lotes y (b) proceso continuo.....	57
Figura 20. Perfil de crecimiento de “ <i>Chlorella vulgaris</i> ” durante en cultivo por lotes y continuo usando medio TARMA sin dilución	58
Figura 21. Fotografía de los reactores con TARMA y BBM luego de 90 h.	60
Figura 22. Proceso propuesto basado en la precipitación ácida y el cultivo de microalga para el tratamiento de ARMA	61



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características fisicoquímicas de aguas residuales de matadero de aves de corral.	8
Tabla 2: Estudios que examinaron la comunidad microbiana de microalgas que crecen y tratan aguas residuales.	17
Tabla 3. Volúmenes de solución estándar de KHP 1000 mgO ₂ /L para la preparación de la recta de calibración de DQO con concentraciones desde 20 hasta 900 mgO ₂ /L.....	46
Tabla 4. Características de ARMA sin tratamiento y comparación con lo reportado por la literatura previamente.	50
Tabla 5. Cultivo de microalgas en TARMA al 75 % y diferente pH inicial del medio. .	54
Tabla 6. Cultivo de microalgas en medio diluido a base de aguas residuales de matadero avícola tratadas con precipitación ácida (TARMA).	56
Tabla 7. Parámetros de TARMA obtenidos después de la precipitación ácida y el filtrado después de una microfiltración del medio con microalga	59

RESUMEN

Las aguas residuales industriales son una de las principales fuentes de contaminación ambiental en los países en desarrollo. Por ejemplo, Perú es el mayor consumidor per cápita de carne de pollo en América del Sur, pero tiene uno de los menores desarrollos tecnológicos para el procesamiento de aves, generando grandes problemas en la cadena de producción por el alto consumo de agua y consecuentemente la generación de grandes volúmenes de aguas residuales. Los efluentes provenientes de matadero de aves de corral (ARMA) presenta un alto contenido de materia orgánica y nutrientes, los cuales, al ser vertidas a ríos y lagos sin previo tratamiento, generan contaminación en el agua y un desequilibrio ecológico. Entre los métodos de tratamiento de ARMA, el proceso biológico representa una alternativa sostenible y ecológica. En este trabajo se estudió la precipitación ácida empleando H_2SO_4 , seguida de cultivo de microalgas "*Chlorella vulgaris*" como método alternativo para el tratamiento de efluentes de la industria avícola. Al reducir el pH del efluente (inicialmente alrededor de 6-7) a pH 4, se removió en forma de sedimentado alrededor del 80 % de la demanda química de oxígeno (DQO). En el sobrenadante, la DQO restante se eliminó de manera eficiente (83 %) mediante el uso de microalgas en un proceso por lotes utilizando un fotobiorreactor de tubo concéntrico de bucle interno (4.5 L). Después de 48 h de proceso, se eliminó el 58 % de los nutrientes (como nitrógeno total) y el 60 % del fósforo. Como consecuencia del proceso, se observó un aumento rápido en la concentración de microalgas desde 0.25 g/L (concentración inicial en biorreactor) hasta 1.2 g/L (después de 3 días). Los resultados alcanzados en este estudio muestran el potencial del método propuesto para el tratamiento de efluentes de la industria avícola desde el punto de vista económico y ambiental, ya que la biomasa microalgal se puede valorizar en un contexto de biorrefinería para la producción de diversos productos.

Palabras clave: Aguas residuales de matadero avícola, precipitación ácida, microalgas, tratamiento de aguas residuales.

ABSTRACT

Industrial wastewater is one of the main sources of environmental pollution in developing countries. For example, Peru is the largest consumer of chicken meat in South America, but has the least technological developments for poultry processing, this leads to major problems in the production chain due to the high-water consumption and consequently the generation of large volumes of wastewater. The poultry slaughterhouse wastewater (PSW) has a high content of organic matter and nutrients, which are discharged into rivers and lakes without an adequate treatment producing water pollution and an ecological imbalance. Among PSW treatment methods, the biological process represents a sustainable and ecological alternative. In this work, acid precipitation was studied using H_2SO_4 , followed by cultivation of microalgae "*Chlorella vulgaris*" as an alternative method for the treatment of effluents from the poultry industry. By reducing the pH of the effluent (around 6-7) to pH 4, around 80 % of the chemical oxygen demand (COD) was removed as sediment. In the supernatant, the remaining COD was efficiently removed (83 %) in the biological process by using microalgae in a batch process using an internal loop concentric tube photobioreactor (4.5 L). After 48 h of process, 58 % of the nutrients (as total nitrogen) and 60 % of phosphorus were removed. As a result of the process, there is a fast increase in the concentration of microalgae from 0.25 g/L (initial concentration in bioreactor) to 1.2 g/L (after 3 days). The results show the potential of the proposed method for the treatment of poultry slaughterhouse wastewater from an economic and environmental viewpoint since microalgae biomass can be valued in a biorefinery context to produce various products.

Keywords: Poultry Slaughterhouse wastewater, acid precipitation, microalgae, wastewater treatment.

INTRODUCCIÓN

El incremento de la población mundial ha generado un aumento en la demanda de alimentos, como es el caso del consumo de carne de aves de corral. Según la FAO, la producción de carne de aves de corral en 2009 fue de 92.2 millones de toneladas (MT) y con un incremento a 107.0 MT en 2017. En 2023, se espera que la producción aumente en un 10 % respecto al año 2017 ¹. El aumento en la producción también conlleva a un aumento en el consumo de agua, por ejemplo, las industrias avícolas consumen cerca del 24 % del total del agua dulce utilizado por la industria alimentaria ².

En caso del Perú, conforme al registro del Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (MIDAGRI), la producción de carne de ave de corral aumentó en 4.3 % del 2018 al 2019; este aumento se debe principalmente a su bajo precio y accesibilidad; los principales productores de carne de pollo son las regiones de Lima (55.4 %), La Libertad (18.3 %), Arequipa (10.4 %) e Ica (4.6 %) ³.

El agua en la industria avícola se utiliza para enfriar, lavar, limpiar y transportar desechos, lo que resulta en un promedio de uso de 20 L de agua por ave en una planta de procesamiento tradicional ⁴. Por lo tanto, se genera gran cantidad de aguas residuales en los mataderos avícolas, efluentes que denominaremos con la abreviatura ARMA. Estos efluentes son considerados como uno de los más contaminantes debido a su alto contenido de materia orgánica, sólidos en suspensión, mezcla compleja de grasas, proteínas, nutrientes, y alta biodegradabilidad, requiriendo cuidados especiales antes de su disposición al medio ambiente ⁵. Sin embargo, a pesar del conocimiento del impacto negativo de los efluentes, las industrias y pequeñas plantas en este sector vienen vertiendo sus efluentes al medio ambiente. Por ejemplo, Germany et al ⁶, informó que, en la ciudad de Pucallpa, Perú, 40 de 53 pequeñas plantas procesadoras de aves no realizan tratamientos de ARMA y muchas de ellas ni siquiera cuentan con protocolos de bioseguridad.

A la actualidad no existe un tratamiento consolidado para este tipo de efluentes; sin embargo, diversas actividades se vienen realizando a fin de conseguir un tratamiento

adecuado. Por ejemplo, recientemente se informó la precipitación ácida utilizando H_2SO_4 para aguas residuales de matadero de diferentes especies animales ⁷, método no utilizado previamente para ARMA. En este proceso, se disminuye el pH del efluente produciendo precipitados, los cuales atrapan y arrastran la materia orgánica en suspensión y coloidal, permitiendo la reducción de materia orgánica, turbidez, nutrientes y carga microbiana. Si bien esta técnica es prometedora para eliminar un alto porcentaje de compuestos orgánicos, no es suficiente para lograr los parámetros establecidos para el vertido conforme la normativa peruana “DS N ° 015-2015-MINAM” que establece los estándares nacionales de calidad ambiental para agua. De esta forma, el posterior tratamiento biológico con especies de microalgas puede ser una alternativa prometedora ya que la biomasa microalgal puede ser utilizado para la producción de varios productos como fertilizantes y/o biocombustibles en un contexto de biorrefinería ⁸.

Las microalgas se han utilizado ampliamente para la biorremediación de aguas residuales; sin embargo, aún no se informa sobre las aguas residuales generadas específicamente por el procesamiento de aves. El cultivo de microalgas en aguas residuales se considera un método más eco-amigable y adecuado que el tratamiento empleando bacterias desde un punto de vista económico y ambiental, una vez que este proceso reduce los contaminantes y patógenos ^{7,9}. Las microalgas tienen una alta tasa de actividades fotosintética que cuando se combinan con la generación de bioproductos, tienen la capacidad de convertirse en una ruta económica para obtener energía sostenible en el futuro. De hecho, se han utilizado varias cepas de algas para el tratamiento de aguas residuales, por ejemplo, *C. vulgaris* podría ser una de las mejores opciones, debido a su alta capacidad de eliminación de nutrientes (N y P), remoción de DQO ¹⁰, habilidad y capacidad para adaptarse a varios tipos y composiciones de aguas residuales ¹¹.

El objetivo de este trabajo fue proponer un método de tratamiento de efluentes provenientes de la industria avícola a través de precipitación ácida con H_2SO_4 y subsecuente tratamiento biológico con el cultivo de microalgas “*Chlorella vulgaris*”, en proceso por lotes y continuo. La eficiencia del proceso se evaluó en función de la eliminación de la demanda química de oxígeno (DQO) y la producción de biomasa microalgal. Además, también se determinaron algunos parámetros de las aguas residuales

antes y después del tratamiento con el propósito de comparar la eficiencia del método propuesto.



HIPÓTESIS

Debido a que las microalgas son capaces de utilizar nutrientes como nitrógeno, fósforo y carbono orgánico para su crecimiento es posible que sea una alternativa útil en el tratamiento de efluentes provenientes de la industria avícola posterior al proceso químico de precipitación ácida con ácido sulfúrico.



DEFINICIÓN OPERACIONAL Y CONCEPTUAL DE LAS VARIABLES

<i>Variables independientes</i>	<i>Indicadores</i>
- pH del efluente	<ul style="list-style-type: none"> - Concentración de DQO (mg O₂/L) - Crecimiento de biomasa microalgal (mg/L) - Carga bacteriana total (UFC) - Turbidez del efluente (UNT) - Distribución de tamaño de partícula (nm)
- pH del medio para el cultivo de microalgas	<ul style="list-style-type: none"> - Concentración de DQO (mg O₂/L) - Concentración de biomasa microalgal (mg/L)
- Concentración de efluente en el medio de cultivo	<ul style="list-style-type: none"> - Concentración de DQO (mg O₂/L) - Crecimiento de biomasa microalgal (mg/L)
- Concentración de inóculo inicial	<ul style="list-style-type: none"> - Concentración de DQO (mg O₂/L) - Crecimiento de biomasa microalgal (mg/L)
<i>Variables dependientes</i>	<i>Indicadores</i>
- Nivel de remoción de DQO	- Porcentaje de remoción de DQO (%)
- Nivel de remoción de nutrientes (Nitrógeno y Fosforo)	- Porcentaje de remoción de nitrógeno y fósforo (%)
- Productividad de la biomasa microalgal	- Productividad de la biomasa microalgal (mg/L.h)

OBJETIVOS

Objetivo general

Proponer un método de tratamiento fisicoquímico de efluente avícola y subsecuente uso para el cultivo de microalgas "*Chlorella vulgaris*" en biorreactores operando en modo continuo.

Objetivos específicos

1. Analizar fisicoquímicamente las aguas residuales de matadero de aves obtenidas de una industria local.
2. Estudiar el efecto de la precipitación ácida a diferentes pH sobre las propiedades fisicoquímicas del efluente como la carga orgánica y la turbidez.
3. Demostrar el potencial de las microalgas "*Chlorella vulgaris*" para la remoción de contaminantes remanentes de efluentes avícolas sometidas previamente a precipitación ácida, evaluando parámetros como pH del medio y dilución del efluente.
4. Analizar configuraciones tipo "lote y continuo" para el tratamiento de efluentes avícolas por microalgas mediante la aplicación de un fotobiorreactor tipo *airlift* de tubos concéntricos.
5. Analizar el efluente tratado resultante después de filtración por membranas para la separación de la biomasa microalgal mediante la determinación de parámetros fisicoquímicos como la demanda química y bioquímica del oxígeno.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Efluentes

Los efluentes corresponden a residuos provenientes de la actividad humana, como los procesos industriales y actividades domésticas, los mismos que pueden ser sólidos, líquidos o gaseosos. Los efluentes líquidos, pueden contener compuestos tóxicos en concentraciones variables, y su composición depende de la clase de efluente que los genera. Estos pueden ser de naturaleza química y/o biológica.

En términos generales, los principales componentes de los efluentes industriales según su origen son:

- Industria metalúrgica: metales tales como cobre, níquel, plomo, zinc, cromo, cobalto, cadmio; ácidos clorhídrico, sulfúrico y nítrico; detergentes.
- Industria papelería: sulfitos, sulfatos, ácidos, materia orgánica, residuos fenólicos, cobre, zinc, mercurio.
- Industria petroquímica: hidrocarburos, plomo, mercurio, aceites, derivados fenólicos y nafténicos, residuos semisólidos.
- Industria de alimentos: nitritos, materia orgánica, ácidos, microorganismos.
- Industrias textiles: sulfuros, anilinas, ácidos, hidrocarburos, detergentes.
- Industria del cuero (curtiembres): cromo, sulfuros, compuestos nitrogenados, tinturas, microorganismos patógenos.
- Industria química (en general): amplia variedad de ácidos orgánicos e inorgánicos, sales, metales pesados.
- Instalaciones sanitarias: microorganismos, jabones, detergentes ¹².

1.1.1 Efluentes avícolas

Dentro de las industrias de alimentos, las industrias avícolas consumen el 24 % del total del agua dulce en comparación con otras industrias como alimentos y bebidas ². Las aguas residuales de matadero de aves de corral (ARMA) presentan

una composición compleja, con alta cantidad de compuestos orgánicos, sólidos suspendidos, aceites y grasas, nitrógeno y fósforo que se generan a partir de las partículas de carne, plumas, piel, residuos de sangre ¹³, desinfectantes y compuestos de limpieza ¹⁴. A su vez las ARMA pueden contener metales pesados, como Co y Zn ^{15, 16}; por lo tanto, se consideran como aguas residuales de alta resistencia ¹⁷. La mayor parte de la materia orgánica proviene de la sangre de aves de corral, pudiendo representar hasta el 90 % de la DBO₅ total ¹⁸. La complejidad de las ARMA también puede aumentar por la presencia de productos químicos utilizados para la desinfección y limpieza, que representando alrededor del 18-20 % del total de aguas residuales generadas dentro de las plantas de procesamiento. Además, la composición de ARMA varía según el tipo de ave, el tipo de sistemas, el equipamiento, los métodos de operación, las cargas de procesamiento y la capacidad de cada instalación de procesamiento avícola ¹⁹. Esta variabilidad se puede ver en las diversas composiciones de ARMA reportada en la Tabla 1.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de aguas residuales de matadero de aves de corral. Adaptado de Terán Hilaes et al ⁵.

Parámetros	Unidades	Chavez et al ²⁰ .	Rajab et al ¹⁷ .	Bastiere et al ²¹ .
pH	-	6.10-7.10	6.8	6.13-7.24
Sólidos totales	mg/L	1082-4558	NR	NR
Sólidos suspendidos totales	mg/L	762-1462	835	1654
DQO total	mg/L	5800-11600	2711	5126
DQO soluble	mg/L	NR	NR	NR
DBO ₅	mg/L	4524-8700	930	2477
N total	mg/L	NR	153	NR
P total	mg/L	7.17-12.74	NR	NR
Aceite y grasa	mg/L	147-666	281	715
Alcalinidad total	mg/L	7.5-12.10	160	499
N total Kjeldahl	mg/L	NR	NR	NR
Turbidez	UNT	NR	>1000	719

*Alcalinidad (como CaCO₃). NA = no analizado; NR= no reportado.

Normalmente, los efluentes provenientes de las diferentes etapas del procesamiento se juntan y se desechan, haciendo esta mezcla mucho más compleja. Una estrategia para prevenir y disminuir la complejidad de ARMA, es la separación de las diferentes corrientes; por ejemplo, separando el torrente conteniendo sangre para no permitir el ingreso a las corrientes de agua, o tratando por separado las aguas residuales generadas en el proceso de limpieza y evisceración que corresponden aproximadamente al 58 % de las aguas residuales en la industria avícola ²². En Perú, no todas las plantas de procesamiento avícola han implementado los sistemas de tratamiento de aguas residuales o procedimientos de disposición de manera adecuada, siendo una necesidad la implementación de nuevos sistemas de tratamiento ⁵.

1.2 Tratamientos de aguas residuales

1.2.1 Tratamiento Primario

El tratamiento primario de aguas residuales separa todas las partículas sólidas grandes que se producen durante el sacrificio. En esta etapa normalmente se emplea los cribadores y tamices como operaciones unitarias para la eliminación de partículas sólidas grandes como plumas, vísceras, etc. Con estas operaciones, es posible reducir hasta el 35 % de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) ².

Otro método de tratamiento primario de ARMA incluye la separación sólida mediante la introducción de aire desde la parte inferior del afluente para transportar las grasas y partículas sólidas a la superficie del tanque, donde se elimina constantemente el sobrenadante por el método de raspado ²³.

Los sólidos suspendidos totales (SST) de ARMA, durante el tratamiento primario, se suelen eliminar por gravedad. He et al ²⁴ reportaron que las concentraciones de SST para los afluentes de aguas residuales de matadero con más de 200 mg/L pueden reducirse en un 35 % a través del tratamiento primario.

1.2.2 Tratamiento Secundario

El tratamiento secundario generalmente consiste en tratamientos biológicos los que se basan en la capacidad de un conjunto de microorganismos de degradar la materia

orgánica presente en el agua residual para su propio crecimiento. Se utiliza para reducir la DBO y los sólidos en suspensión del efluente a niveles aceptables. En algunos casos, el tratamiento secundario puede eliminar nutrientes, como nitrógeno y fósforo ²⁵. Este proceso puede eliminar aproximadamente el 90 % de la DBO y el 90 % de sólidos suspendidos ²⁶.

La biomasa suspendida es un factor importante en la selección de una técnica de tratamiento biológico adecuada. Los tratamientos biológicos pueden ser anaerobios y aerobios:

a) Sistemas de tratamiento anaeróbico (STA)

La digestión anaerobia es un proceso llevado a cabo utilizando microorganismos anaerobios que transformarán, en ausencia de oxígeno, la materia orgánica en metano y CO₂, los cuales suelen ser aprovechados para la producción de biogás. Sin embargo, el alto contenido orgánico puede afectar negativamente la eficiencia de proceso anaeróbico ²⁷. Por lo tanto, para los sistemas anaeróbicos se recomienda un tratamiento posterior para eliminar fósforo total (PT), nitrógeno total (NT) y microorganismos patógenos ²³ del agua resultante.

Las cámaras de filtración anaeróbica (CFA) son un sistema donde el flujo de aguas residuales se mueve sobre los reactores biológicos de lecho fijo con compartimento de filtración. Las partículas (biomasa) son sostenidas dentro y luego fijadas al filtro de superficie. El sistema CFA se aplica como tratamiento secundario debido a altas tasas de recuperación de biogás y alta eliminación de partículas sólidas ².

La laguna anaerobia (LA) es un método común y popular en las regiones donde la disponibilidad de campo y clima permite su estructura. La entrada de las aguas residuales desde el fondo de la laguna se mezcla con gas. La profundidad de LA oscila entre 3 y 5 m. La literatura afirma que este método llega a eliminar el 97 % de SST, el 96 % de DQO y 95 % de DBO₅ ²³. La principal desventaja del sistema son las condiciones climáticas y la producción de olores. Sin embargo, la laguna anaeróbica se considera una operación de bajo costo y una opción eficiente para tratar productos orgánicos de aguas residuales ²⁸.

b) Sistema de tratamiento aeróbico

Los microorganismos aerobios eliminan los materiales orgánicos en presencia de oxígeno. El objetivo principal de los sistemas aeróbicos es eliminar el material orgánico insoluble y soluble de las aguas residuales ²³.

Muchos autores han demostrado que usar unidades de tratamiento aeróbico (UTA) en el tratamiento de ARMA es ventajoso debido a los requisitos mínimos de espacio, bajo costo de capital y excelentes eficiencias de eliminación de DQO (alrededor del 83 %) ²⁹.

Por ejemplo, Pabon y Gelvez ³⁰, investigaron un reactor aeróbico de lodo activado a gran escala (144 L) conteniendo concentraciones iniciales de BOD₅, DQO y SST del crudo de ARMA y de 5242, 9040 y 2973 mg/L respectivamente. La eliminación máxima alcanzada fue de 89.73 % para DBO₅, 89.03 % para DQO y 94.09 % para SST con tiempo de retención hidráulica (TRH) de 2 días y una tasa de afluencia de aguas residuales de 1.38 L/s.

Fongsatitkul et al ³¹, estudiaron un sistema aeróbico para tratar el efluente de ARMA usando reactores de 10 L en paralelo con flujo continuo y reciclaje interno, logrando una eficiencia de eliminación de hasta 97.60 % y 89 % para DQO y fósforo total (PT) respectivamente, mientras que el nitrógeno total Kjeldahl (TKN) total se eliminó en un 81.50 %.

Bustillo-Lecompte et al ³² evaluaron el desempeño de un sistema aeróbico para el tratamiento de ARMA. Las concentraciones iniciales de carbono orgánico total (COT) y nitrógeno total (NT) fueron de 1009 y 254 mg/L, respectivamente. El estudio mostró que el proceso de lodo activado eliminó 73.46 % de NT y 95.03 % de COT en el crudo de ARMA.

1.2.3 Tratamiento Fisicoquímico

Los tratamientos fisicoquímicos suelen ser utilizados para disminuir la cantidad de contaminantes específicos que quedan después de tratamiento primario y secundario, estos pueden ser:

a) Electrocoagulación (EC)

El sistema de la EC es una tecnología efectiva para el tratamiento de ARMA debido a su capacidad de remoción de nutrientes, metales pesados y patógenos utilizando corriente eléctrica sin aditivos químicos ³³. Consiste en la desestabilización de los contaminantes suspendidos del agua, mediante la acción de corriente eléctrica directa de bajo voltaje. En este proceso, se genera una elevada carga de protones que desestabilizan los contaminantes del agua residual, formando hidróxidos complejos, los cuales producirán agregados (flóculos) con los contaminantes facilitando su separación ³⁴.

b) Tecnología de Membranas

En el tratamiento de aguas residuales, las membranas son barreras que permiten el paso del agua, pero impiden el paso de sustancias no deseadas. El fluido pasa a través de la membrana debido a la diferencia de presión entre un lado de la membrana y el otro, permaneciendo así los contaminantes en un sólo lado.

La microfiltración (MF) utiliza una membrana con tamaño de poro entre 0.1 μm y 10 μm , este proceso permite la separación de sólidos en suspensión, partículas finas, coloides, algas y microorganismos como bacterias. Las membranas del proceso de ultrafiltración (UF) tienen un tamaño de poro de 0.04 y 0.1 μm , permitiendo así la separación de macromoléculas. Las membranas de nanofiltración son de estructura microporosa y pueden retener partículas con un tamaño de 0.1 nm-0.001 μm , permitiendo la separación de sustancias orgánicas (proteínas, azúcares), microorganismos y algunas sales multivalentes. Las membranas de ósmosis inversa (OI) son hidrófilas para que las moléculas de agua sean atraídas fácilmente y por difusión sean transportadas a través de la estructura polimérica de la membrana y posteriormente difundirse a través de ella; se suelen utilizar para la desalación de agua, ya que permite la eliminación de sales, así como de compuestos orgánicos de bajo peso molecular.

Borowitzka ³⁵ utilizó el proceso de UF para tratar ARMA con 68.54 mg/L de NT y 181.44 mg/L de DQO. El estudio reveló que la eliminación máxima de DQO y NT fue 94.52 y 44 %, respectivamente.

Almandoz et al ³⁶ investigaron la efectividad de filtración de la membrana compuesta de cerámica de UF para tratar las aguas residuales del matadero. El estudio registró una alta eficiencia de eliminación de bacterias del 99 %, mientras se eliminó DQO y NT en 90.63 % y 45.22 %, respectivamente.

1.3 Precipitación ácida en efluentes industriales

Se ha estudiado extensivamente el tratamiento de aguas residuales con productos químicos, adaptando estrategias como las precipitaciones (coagulación / floculación) mediante el uso de compuestos inorgánicos (alumbre o sulfato de aluminio, cloruro férrico, cloruro de polialuminio y aluminato de sodio e hidróxido de calcio) ³⁷. De hecho, el uso de compuestos inorgánicos resulta en una alta eficiencia para eliminar las partículas en suspensión de las aguas residuales. Sin embargo, estos procesos pueden llegar a producir lodos tóxicos; así mismo, la alta carga de coagulantes inorgánicos (como el aluminio) podrían incrementar la concentración de metales en el agua, lo que puede ser perjudicial para la salud humana. Además de esto, las características físicas (color) y químicas del agua pueden cambiar dificultando su eliminación ⁵.

Como alternativa, un nuevo método basado en la precipitación ácida en aguas residuales de suero de queso ³⁸ y lixiviados de vertedero ³⁹ ha sido reportado. El cambio del pH origina precipitados, que atrapan y arrastran la materia en suspensión y coloidal, permitiendo la reducción de materia orgánica, turbidez, fósforo total y nitrógeno ⁷.

En el trabajo de Prazeres et al ³⁸ la precipitación ácida en aguas residuales de suero de queso permitió eliminaciones promedio de DQO y DBO de alrededor del 21 y 41 % (pH=1.0), respectivamente. Sin embargo, en un proceso de coagulación-floculación con FeSO_4 ⁴⁰ la clarificación del sobrenadante fue más eficaz, donde la eliminación de la turbidez puede tener valores próximos al 97 %, en comparación con el 12 % para la reducción de la turbidez y el 21 % de la reducción de SST encontrados en este trabajo. Por otro lado, el factor de biodegradabilidad ($\text{DBO/DQO} \approx 0,89 \pm 0,10$) del sobrenadante obtenido posterior a la precipitación ácida es aproximadamente 2 veces

mayor en comparación con los resultados obtenidos por coagulación-floculación con FeSO_4 . Este efecto puede ser causado por el alto agotamiento de nutrientes en el proceso de FeSO_4 , como fósforo 89 % y compuestos de nitrógeno 43 %. Así, la menor eliminación de los nutrientes, aproximadamente el 18 %, encontrados en la precipitación ácida pueden constituir una ventaja para la aplicación de un post-tratamiento biológico ³⁸.

A su vez Prazeres et al ⁷, trataron aguas residuales de mataderos por precipitación ácida (H_2SO_4 , HCl y HNO_3). Al agregar H_2SO_4 , obtuvieron la máxima eliminación de materia orgánica, medida como DQO a pH 6, con la mínima remoción observada a pH 1. La baja precipitación de compuestos a pH bajo, según los autores, se puede atribuir a repulsión electrostática entre las partículas y moléculas, manteniéndolas en solución/suspensión.

Teniendo en cuenta la composición de las aguas residuales de los mataderos, el contenido de proteínas podría alcanzar hasta el 35-70 % de la DQO total en las aguas residuales de los mataderos de aves de corral ^{41,42}. Considerando el punto isoelectrico (IP) de las proteínas disueltas en las aguas residuales de los mataderos de aves de corral, que es de alrededor de 4.6 ⁴¹, se espera que tenga una precipitación más eficaz, añadiendo H_2SO_4 a un pH cercano a 4.6 ⁵.

1.4 Tratamiento de efluentes industriales con microalgas

La aplicación de microalgas en el tratamiento de aguas residuales data aproximadamente de 1940. El objetivo fundamental de la aplicación de microalgas para el tratamiento de aguas residuales es la utilización y biotransformación de los nutrientes a biomasa.

Este proceso presenta ventajas tan importantes como son: el mejoramiento de la calidad del efluente, el aprovechamiento de nutrientes que están siendo desechados, la producción de biomasa aprovechable (microalga) y la remoción de sales (amonio, nitritos, nitratos, ortofosfatos), el aumento del pH de los efluentes (proceso fotosintético), lo cual favorece la precipitación de ortofosfatos, la disminución de la demanda biológica de oxígeno, la oxigenación del agua favoreciendo la oxidación

continua de materia orgánica, la acción bactericida, reduciendo la sobrevivencia de organismos patógenos, la captura y utilización de CO_2 , por el proceso fotosintético, entre otros beneficios ⁴³.

El tratamiento de aguas residuales a base de microalgas (Figura 1), ha ganado recientemente interés a nivel global, principalmente porque, por un lado, las aguas residuales son tratadas y por otro lado, produce un valor en forma de biomasa de microalgas para la generación de biocombustibles u otros productos químicos en un contexto de biorrefinería ^{44, 45}.

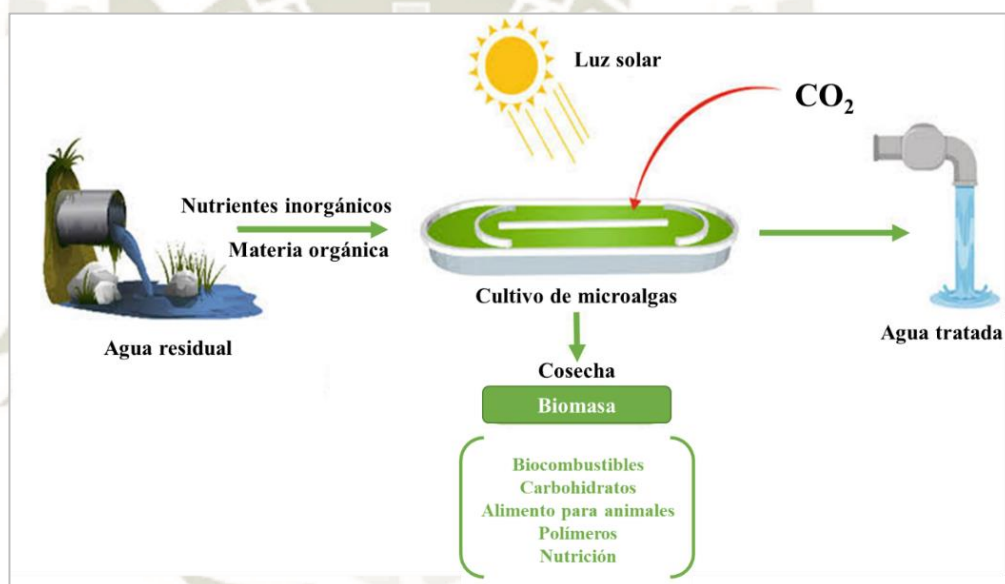


Figura 1. Esquema del cultivo de microalgas para el tratamiento de aguas residuales. Adaptado de Zerrouki et al ⁴⁶.

Los desechos animales, como de aguas residuales de procesamiento de aves de corral (ARMA), contienen todos los nutrientes requeridos para el cultivo de algas a bajo costo ⁴⁷. Estudios han demostrado que el extracto acuoso de desperdicios de aves de corral potencia un 180 % más del crecimiento de la biomasa de algas en comparación con la que se cultiva en un medio sintético ⁴⁸. Junto con la eliminación de nutrientes con las aguas residuales, las algas también pueden eliminar ciertos metales pesados ⁴⁹. En el trabajo de Choi ⁵⁰ se evaluó el uso de perlas de sericita y microalgas “*Chlorella*”

para la eliminación de metales pesados (hierro, cobre, zinc, manganeso, arsénico, cadmio) y la mejora simultánea de la productividad de la biomasa. Los resultados mostraron que la producción de biomasa aumentó en ~ 8.04 veces su concentración inicial de 0.367 g/L medida por un fotobiorreactor de panel óptico. Se encontró que el porcentaje de eliminación simultánea de Fe, Cu, Zn, Mn, As y Cd del efluente era del 97.78 al 99.26 %.

Una especie de microalga que se destaca en el campo de tratamiento de aguas residuales es la "*Chlorella vulgaris*", su relevancia para el tratamiento de aguas residuales es reflejada en el número de publicaciones en los últimos años, por ejemplo, de acuerdo con la búsqueda con el término "*chlorella* AND *vulgaris* AND *wastewater*" en la base de datos SCOPUS, aproximadamente el 57 % de los artículos de investigación se publicaron entre 2018 -2021. Por otro lado *C. vulgaris* carece de estudios previos en el para el tratamiento de aguas residuales de mataderos de aves de corral (ARMA) convirtiéndola en una propuesta de trabajo innovadora.

1.4.1 Simbiosis de microalgas y bacterias en el tratamiento de aguas residuales.

Las relaciones entre microalgas y bacterias en las aguas residuales son complejas debido a las diferentes interacciones entre la biota. En muchos casos, las bacterias utilizan compuestos complejos de carbono producidos por las microalgas ⁵¹. A su vez, las bacterias pueden convertir macro y micronutrientes en compuestos utilizables para microalgas ^{52, 53}, así como secretar vitaminas y otros cofactores que son necesarios para el crecimiento de algunas microalgas ⁵⁴. Algunas bacterias especializadas también pueden producir auxinas que mejoran el crecimiento de microalgas ⁵⁵. En muchos casos, las bacterias que benefician a las plantas también pueden beneficiar a las microalgas de manera similar ⁵⁶. Además, las microalgas producen O₂ que las bacterias pueden utilizar para la respiración y producen CO₂ para que lo utilicen las microalgas ^{57,58}. En muchos entornos, las bacterias y microalgas también pueden competir por los mismos nutrientes inorgánicos, O₂ y espacio. En estas condiciones, se ha descubierto que las bacterias y microalgas producen productos inhibidores (es

decir, las algas pueden producir bactericidas, mientras que las bacterias pueden producir alguicidas) ⁵⁹.

Varios estudios han empleado métodos basados en secuenciación para clasificar los microorganismos que se encuentran en aguas residuales de diversas fuentes donde fueron cultivadas microalgas (Tabla 2).

Tabla 2: Estudios que examinaron la comunidad microbiana de microalgas que crecen y tratan aguas residuales. Adaptado de Paddock et al ⁵⁹.

Cultivo	Agua residual	Organismo Bacterial dominante	Remoción (%)	Fuente
Mixto de algas	Digestado anaerobico de efluentes de porcinos	Proteobacteria, Archaea		Patil et al ⁶⁰ .
Mixto de algas Cyanobacterias dominante	Municipales	Bacteroidia, bacteroidetes, protobacteria	DQO=98 TKN=88 PT=65	Su et al ⁶¹ .
Mixto de algas + Lodo activado de aguas residuales (5:1)	Municipales	Proteobacteria, Bacteroidetes	DQO>91 NT=91 PT=94	Su et al ⁶² .
Mezcla de microalgas (Scenedesmus dominante)	Municipales+ agua de lago	Proteobacteria, Bacteroides	NT=49 N-NH4=100 PT=100	Krustok et al ⁶³ .
Mezcla de algas (Chlorella vulgaris y Pseudanabaena dominantes)	Sintéticas	Proteobacteria	COT=88 NT=76 N-NH4=95	Alcántara et al ⁶⁴ .
Mezcla de algas (Chlorella sp dominante)	Laguna porcina	Proteobacterias, Bacteroidetes	DQO=88 N-NH4=98 PT=93	Ye et al ⁶⁵ .
Chlorella sorokiniana	Vinícolas	Proteobacteria, Bacteroidetes	DQO=-70 NT=100 N-NH4=100	Higgins et al ⁶⁶ .

En los estudios informados, se observó que las *proteobacterias* eran un filo dominante independientemente de las condiciones de las microalgas/ aguas residuales. De los estudios que analizaron la eliminación de nutrientes, todos mostraron altas tasas de

eliminación (49 % a 100 %) de fuentes de nitrógeno (NT, TKN, N-NH₄) con nitrógeno en forma de N-NH₄ que tiene las tasas de eliminación más altas (95 % a 100 %). Además, las tasas de eliminación de fosfato también fueron altas (65 % a 100 %). A su vez, la mayoría de los estudios mostraron una disminución en la concentración de carbono orgánico (DQO, COT) (88 % a 98 %), excepto el estudio que analizó el crecimiento de “*Chlorella sorokiniana*” (- 70 %) en aguas residuales de bodegas de vino ⁶⁶.

1.5 Biología de las microalgas

Las microalgas se encuentran presentes en todos los ecosistemas, tanto acuáticos como terrestres, lo que implica una gran variedad de especies que viven en diferentes condiciones ambientales ⁶⁷. Estas representan una de las formas de vida más antigua que se conoce, son plantas primitivas que no poseen raíces, tallo ni hojas. Las algas pueden ser células procariotas o eucariotas.

Las procariotas o *cyanobacterias* no presentan un núcleo definido, sino que su material celular se concentra en una región del citoplasma denominada nucleóide, además carecen de mitocondrias, aparato de Golgi, flagelos y son más parecidos a bacterias que a algas.

Las eucariotas a diferencia de las procariotas son células que tienen un núcleo definido, en donde se localiza el material genético. Estas deben su color a la clorofila, carotenoides y xantofilas presentes en su estructura; las más importantes son las algas verdes o *Chlorophyta*, algas rojas o *Rhodophyta* y diatomeas o *Bacillariophyta* ⁶⁸.

Las algas por su forma de sintetizar los compuestos pueden ser autótrofas o heterótrofas. Las autótrofas requieren únicamente de compuestos inorgánicos como CO₂, sales y luz para su crecimiento; en cambio las heterótrofas no son fotosintéticas por lo que requieren de una fuente externa de compuestos orgánicos, nutrientes y una fuente de energía; sin embargo, existen ciertos géneros que pueden ser mixotróficos, es decir que tienen la capacidad de realizar la fotosíntesis y adquirir nutrientes orgánicos exógenos ⁶⁸.

1.6 Cultivo de microalgas

1.6.1 Parámetros para considerar en un sistema de cultivo de microalgas

A comparación con otros sistemas de tratamientos de aguas, los cultivos de microalgas son considerados como una tecnología de mediana complejidad ⁶⁹. Al tratarse de organismos vivos involucran una serie de parámetros que deben ser considerados, evaluados, determinados y medidos para realizar con éxito un cultivo:

a) Especies de microalgas

Depende directamente de la finalidad que se le desea brindar a la biomasa resultante (pigmentos, alimento) y/o si el cultivo es para fitorremediación ^{70, 71, 72}.

Las microalgas en un cultivo para fitorremediación deben cumplir con 4 condiciones: alta tasa de crecimiento; alta tolerancia a la variación estacional y diurna si es un sistema abierto y altos niveles de componentes celulares valiosos ⁷³.

Algunas especies de microalgas presentes en aguas contaminadas son utilizadas en tratamientos de aguas residuales por su elevada tolerancia ^{71, 82, 83}. Los géneros *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus*, *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Oscillatoria*, *Micractinium*, *Golenkinia*, *Phormidium*, *Botryococcus*, *Spirulina*, *Nitzschia*, *Navicula* y *Stigeoclonium* son las más comunes ^{35, 72, 74}. Varias de estas especies de microalgas son comercialmente interesantes para la alimentación humana y/o animal, la obtención de biocombustibles, aceites esenciales, pigmentos, entre otros usos ^{35, 75}.

b) Luz

La intensidad lumínica es uno de los principales parámetros a considerar en un cultivo ⁷⁶. Las microalgas son fotótrofas, lo que significa que convierten la energía de la luz en energía química en la fotosíntesis, pero una gran parte se pierde en forma de calor. Oswald ⁷⁷ informa que, en estanques al aire libre, más del 90 % de la energía solar incidente total se puede convertir en calor y menos del 10 % en energía química.

Hay varias estrategias que utilizan las microalgas para permanecer cerca de la superficie del agua con el fin de captar suficiente luz disminuyendo la gravedad específica y, por lo tanto, minimizando su tasa de hundimiento ⁷⁸. Sin embargo, no todas las microalgas pueden flotar en la superficie y por esa razón, las algas en las partes más profundas de un recipiente de cultivo pueden tener limitaciones de luz.

Además, en cultivos densos, las propias algas pueden disminuir la disponibilidad de luz debido al sombreado interno ^{79, 80}. Cuando se cultiva en aguas residuales sin tratar, este efecto de sombra también puede agravarse aún más por la presencia de un alto contenido de material particulado ⁷⁹. Para evitar esto, la turbulencia es esencial, ya que expone todas las células a la luz durante al menos períodos cortos, lo que hace posible una alta productividad.

La forma más sencilla de evitar que los cultivos de algas se limiten a la luz es disminuir la profundidad del recipiente de cultivo. Según Lembi ⁸¹ la productividad en estanques con poca luz está inversamente correlacionada con la profundidad. Generalmente, se recomiendan profundidades de entre 15 y 50 cm ^{82, 83}.

Aunque la luz suele limitar el crecimiento de microalgas, demasiada luz también puede causar una menor eficacia fotosintética, lo que se conoce como fotoinhibición ^{79, 84}. Para evitar que las algas en la superficie se expongan a niveles inhibidores de luz, también en este caso es crucial una mezcla precisa.

Un sistema de mezcla eficiente permitirá un acceso periódico de todas las células a la luz, de lo contrario, será perjudicial puesto que la intensidad lumínica decrece con el aumento de la turbidez ^{76, 85}.

c) Temperatura

El aumento de temperatura mejora el crecimiento de algas hasta que se alcanza la temperatura óptima ^{86, 87, 88}. Un aumento adicional de la temperatura conduce a una rápida disminución de la tasa de crecimiento. El sobrecalentamiento de los cultivos de algas es un problema especialmente en climas húmedos donde la evaporación es inhibida ⁸⁹.

En general, las temperaturas alrededor de 15–25 °C parecen adaptarse a la mayoría de las especies de algas, incluso aquellas que están adaptadas para crecer a temperaturas más frías ⁸⁸.

d) pH

La tasa de crecimiento de las microalgas y la composición de las especies también pueden verse afectadas por el pH. En cultivos de algas, el pH generalmente aumenta debido a la asimilación fotosintética de CO₂ ^{79, 90}. Los valores de pH superiores a 10

no son infrecuentes cuando no se suministra CO_2 ⁹¹ y el pH puede llegar a 11, más si el CO_2 es limitante y se utiliza bicarbonato como fuente de carbono ⁹².

La absorción de nitrógeno por las algas también afecta el pH del medio. La asimilación de iones de nitrato tiende a elevar el pH. El pH alto puede inducir la floculación de algunas algas, lo que a su vez conduce a una menor absorción y crecimiento de nutrientes ⁷⁹.

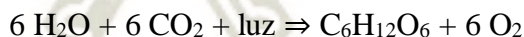
Para evitar valores extremos de pH, la turbulencia puede promover el intercambio de gases entre el agua y el aire, lo que a su vez regula algo el pH en el agua ⁷⁷.

e) Carbón y nutrientes

Según las proporciones que se encuentran con mayor frecuencia en las aguas residuales, el fósforo rara vez limita el crecimiento de las algas, pero el nitrógeno puede hacerlo ⁷⁹. Sin embargo, dado que las aguas residuales a menudo exponen a las algas a concentraciones de nutrientes de hasta tres órdenes de magnitud más altas que en condiciones naturales, es más probable que el crecimiento esté limitado por el carbono y la luz ⁹³.

Carbón

Las microalgas asimilan carbono inorgánico en la fotosíntesis. La energía solar se convierte en energía química con oxígeno (O_2) como subproducto y en un segundo paso, la energía química se utiliza para asimilar el dióxido de carbono (CO_2) y convertirlo en azúcares. La fórmula estequiométrica general para la fotosíntesis es:



Las especies de carbono inorgánico normalmente utilizadas por las microalgas son el CO_2 y el ion bicarbonato, este último requiere la enzima anhidrasa carbónica para convertirlo en CO_2 . Además de estos, algunas especies de algas también pueden utilizar fuentes de carbono orgánico, como ácidos orgánicos, azúcares, acetato o glicerol. En varias especies de algas, el modo de nutrición del carbono se puede cambiar de autotrofia a heterotrofia cuando se cambia la fuente de carbono; este es el caso de las algas verdes "*Chlorella*" y "*Scenedesmus*" ⁹⁴.

La menor disponibilidad de CO_2 puede limitar el crecimiento de las algas, sin embargo, este efecto no suele ser muy pronunciado. Dado que la adición de CO_2 es uno de los elementos más costosos en los cultivos masivos de algas de alta densidad, puede resultar económicamente beneficioso sacrificar parte de la producción para ahorrar CO_2 ⁹⁵.

Nitrógeno

Los compuestos nitrogenados más comunes asimilados por las microalgas son el amonio y el nitrato ⁸⁴. Además de estos compuestos nitrogenados, la urea y el nitrito se pueden utilizar como fuentes de nitrógeno ⁹⁴. Las cianobacterias también son capaces de asimilar los aminoácidos arginina, glutamina y asparagina y algunas especies pueden fijar gas nitrógeno (N_2) ⁹¹. Varias microalgas pueden absorber nitrógeno en exceso de las necesidades metabólicas inmediatas, lo que se denomina consumo de lujo, el cual puede utilizar más tarde en el caso de falta de nitrógeno ⁸³.

El nitrógeno a su vez es un factor crítico para regular el contenido de lípidos de las microalgas. Típicamente, las microalgas tienen un contenido lipídico aproximadamente del 20 %, pero cuando el nitrógeno se convierte en el factor limitante del crecimiento, la acumulación de los niveles de lípidos aumenta en más de 40 % ⁷¹.

Fósforo

El fósforo es fundamental en muchos procesos celulares, tales como la formación de ácidos nucleicos y transferencia de energía ⁶⁷. Es absorbido por las algas como ortofosfato inorgánico (PO_4^{3-}). Los fosfatos orgánicos se pueden convertir en ortofosfatos por las fosfatasas en la superficie celular y esto ocurre especialmente cuando el fosfato inorgánico es escaso. Las microalgas son capaces de asimilar el fósforo en exceso, que se almacena dentro de las células en forma de gránulos de polifosfato (volutina). Estas reservas pueden ser suficientes para un crecimiento prolongado en ausencia de fósforo disponible. Por lo tanto, la tasa de crecimiento de un alga puede no responder de inmediato a los cambios en la concentración externa de fósforo ^{81, 92}.

1.6.2 Fases de crecimiento de las microalgas

Existen de 3 a 5 fases generalmente reconocidas en el crecimiento de la población de microalgas las cuales se muestran en la Figura 2:

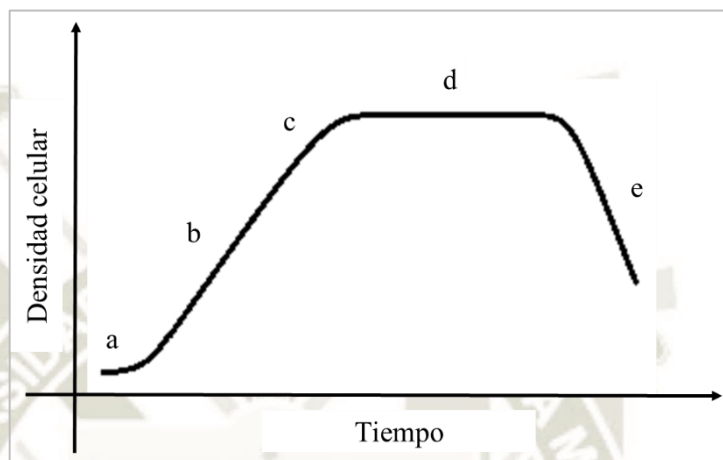


Figura 2. Curva típica de crecimiento de un cultivo de microalgas.

a) Fase de latencia o adaptación

En esta fase las células en el cultivo apenas empiezan a absorber los nutrientes presentes en el medio, no se registra un incremento aparente en el número de células, debido a que las células viables no se encuentran en las condiciones adecuadas para dividirse inmediatamente.

b) Fase Exponencial

Las células se han adaptado a su nuevo entorno, comienzan a multiplicarse y crecen de forma exponencial. Si se controla la dilución del cultivo esta etapa puede controlarse por semanas. Es recomendable cosechar las células durante la fase exponencial si se van a usar estas células como inóculos para otros cultivos ya que se dividen más rápidamente que las células tomadas de otras fases.

c) Fase de crecimiento lineal

La biomasa empieza a acumularse a una tasa constante, el crecimiento se hace lineal y la energía ya no se produce para la sobrevivencia de las células.

d) Fase estacionaria

El número de células alcanzado se mantiene constante por cierto período de tiempo debido al balance entra la natalidad y la mortalidad que presenta el cultivo.

e) Fase de muerte

En esta fase las células empiezan a morir, aunque pueden durar en la fase estacionaria semanas e incluso meses ⁶⁷.

1.6.3 Principales tipos de cultivo de microalgas

a) Cerrado

Un sistema cerrado es aquel que una vez puestos los elementos básicos: el inóculo microalgal y el medio de cultivo, estos no se renuevan, siendo finalmente cosechados al alcanzar su concentración máxima o al finalizar su fase exponencial.

b) Cultivo semicontinuo

Los cultivos semicontinuos son un tipo de cultivo que se diluyen a intervalos regulares, de tal manera que a la población se le permite crecer hasta que alcance una densidad deseada, se cosecha parcialmente y después se adiciona una cantidad igual de medio de medio fresco. La concentración de biomasa es monitoreada para estimar la frecuencia y la proporción adecuada de dilución. Este tipo de cultivo se emplea frecuentemente en los sistemas de producción de microalgas debido a su simplicidad y a la ventaja que representa obtener raciones de alimento diariamente.

c) Cultivo continuo

En los sistemas continuos de cultivo, las microalgas son cosechadas continuamente y reciben un constante llenado del medio nutritivo, en el cual el nivel de crecimiento está gobernado por la cantidad del nutriente limitante. Este cultivo permite un crecimiento exponencial continuo, lo cual es posible cuando todos los factores que estimulan el crecimiento celular son balanceados por aquellos factores que contribuyen a la pérdida de células, para que la concentración celular se mantenga constante ⁹⁶.

1.6.4 Sistemas de cultivo de microalgas

Los dos sistemas principales para el cultivo de microalgas son sistemas cerrados y abiertos. Los sistemas cerrados permiten un mayor control de las condiciones de

crecimiento, mientras que los sistemas abiertos dependen en gran medida de factores externos y están en contacto al aire libre ⁹⁷. Una tercera solución para el cultivo de microalgas es la inmovilización, donde las células quedan atrapadas en un medio sólido

a) Sistemas abiertos - estanques

Para el cultivo comercial de algas, se suelen utilizar estanques con canales poco profundos y estanques circulares con un brazo giratorio para mezclar el cultivo ⁸⁸. Para el tratamiento de aguas residuales se suelen utilizar los estanques de alta tasa de crecimiento de algas (EATCA).

Un EATCA (Figura 3), suele tener menos de un metro de profundidad, se mezcla continuamente mediante agitación suave y es aeróbico en todo su volumen ⁷⁷. En los EATCA, las microalgas suministran oxígeno a las bacterias heterótrofas y los nutrientes de las aguas residuales se convierten en biomasa de algas y bacterias ⁹⁸.

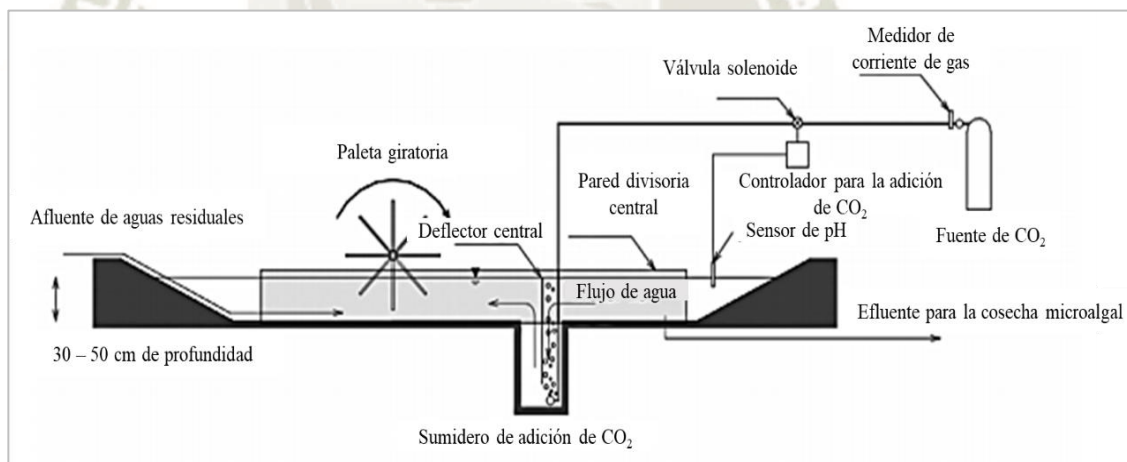


Figura 3. Vista lateral de un estanque de alta tasa de microalgas con adición de CO_2 . Adaptado de Randrianarison et al ⁹⁹.

b) Fotobiorreactores cerrados

Los fotobiorreactores cerrados suelen tener mejores características para la penetración de la luz que los estanques abiertos, sin embargo, requieren más energía, por lo tanto, el costo operativo es mayor. Se pueden agrupar en dos clases principales: canales

cubiertos y reactores tubulares ⁸⁸. En los reactores tubulares se usan tubos transparentes para el cultivo, minimizando el efecto de sombra entre las algas. La refracción de la luz creará áreas sombreadas en los tubos, y por lo tanto es necesaria una turbulencia para proporcionar luz a todas las células ¹⁰⁰. Los reactores tubulares pueden colocarse vertical u horizontalmente y construirse de varios materiales, rígidos o blandos ¹⁰¹.

c) Algas inmovilizadas

En este se atrapa a las algas en un medio sólido. El medio que puede ser, por ejemplo, alginato o polímeros sintéticos, inmovilizando las algas, pero permitiendo que las sustancias del agua se difundan a las células ¹⁰².

Las algas inmovilizadas se han probado para varios propósitos de tratamiento de aguas residuales. Se ha demostrado que la absorción de metales, nitrógeno y fósforo y las tasas de absorción de nutrientes son similares para las células libres e inmovilizadas ⁹³. Se han realizado estudios sobre algas inmovilizadas tanto para células vivas como muertas. Las células vivas se estudian principalmente para la absorción de nutrientes, mientras que las células muertas se estudian principalmente para la adsorción de metales ¹⁰².

1.6.5 Fotobioreactores tubulares verticales

Los fotobioreactores tubulares verticales son los más adecuados para el cultivo masivo de microalgas al aire libre, debido a su gran superficie. Los cultivos se hacen circular con una bomba de aire o mediante un sistema de transporte aéreo. Los fotobioreactores tubulares verticales se clasifican en reactores de columna de burbujas (*column bubble*) y sistema de transporte aéreo (*airlift*), según su modo de flujo de líquido ¹⁰³.

a) Columna de burbujas

En los fotobioreactores de columna de burbujas (Figura 4), la agitación y la mezcla se logra mediante el burbujeo de gas. La hidrodinámica de la columna y las características de transferencia de masa dependen completamente del comportamiento de las burbujas liberadas por el rociador ¹⁰⁴. Dado que la luz se proporciona externamente, la eficiencia fotosintética depende en gran medida de la tasa de flujo del gas.

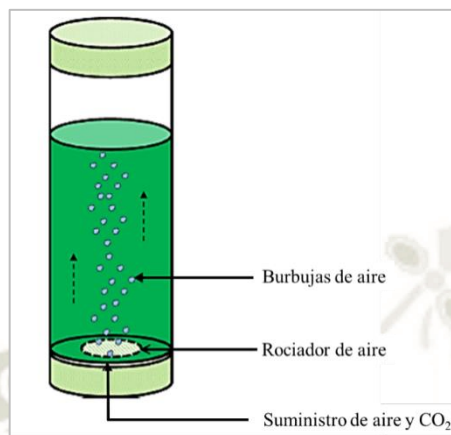


Figura 4. Esquema de un fotobioreactor de columna de burbujas.
Adaptado de Gupta et al ¹⁰³.

b) Reactor de transporte aéreo (Airlift)

Los fotoreactores de transporte aéreo se diferencian de los fotoreactores columna de burbujas debido a la separación física de las dos zonas interconectadas, la corriente ascendente (flujo ascendente) y descendente (flujo descendente). El gas se burbujea a través de una canalización ascendente, lo que produce una retención de gas, reduciendo la densidad del fluido y finalmente, haciendo que el líquido del flujo ascendente se mueva hacia arriba. A medida que las burbujas de gas se desprenden del líquido en la parte superior del recipiente, se deja que un líquido más pesado sin burbujas recircule a través de la esquina inferior. Por lo tanto, la circulación de líquido en los reactores de transporte aéreo es el resultado de la diferencia de densidad entre el flujo ascendente y el descendente ¹⁰⁴. Los reactores de transporte aéreo tienen la ventaja característica de crear un patrón de mezcla circular en el que el cultivo líquido pasa continuamente a través de las fases oscura y clara dando un efecto de luz intermitente a las células de las algas ¹⁰⁵. Las configuraciones de reactor de transporte aéreo más comunes son: bucle interno, bucle interno concéntrico y buques de bucle externo (Figura 5).

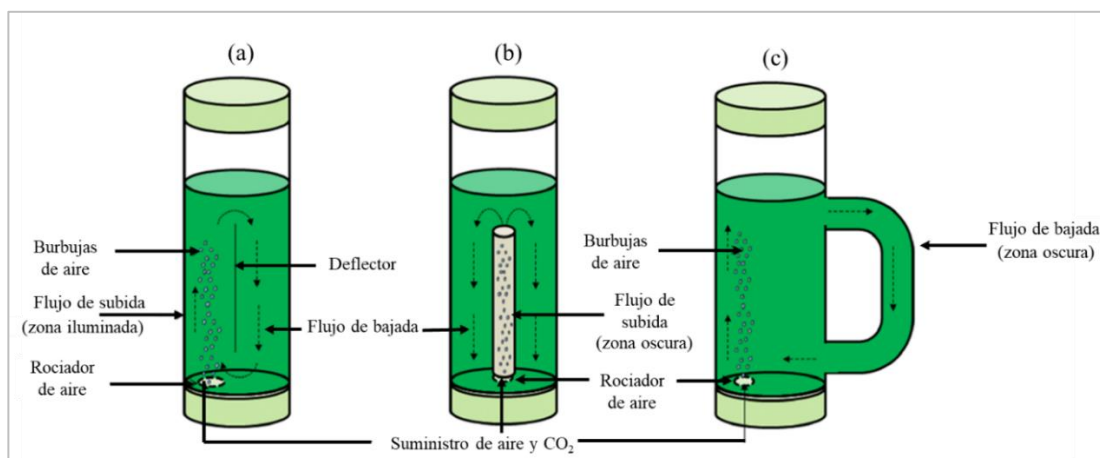


Figura 5. Esquema de un fotobiorreactor de transporte aéreo (a) bucle interno, (b) bucle interno concéntrico, (c) bucle externo. Adaptado de Gupta et al ¹⁰³.

1.6.6 Biorrefinería de la microalga

Como materia prima de biomasa renovable, las algas proporcionan varios beneficios en comparación con otras plantas terrestres, tales como:

- Tasas de crecimiento rápido con cosecha de biomasa de hasta 125 toneladas por hectárea en 1 año ¹⁰⁶.
- Acumulación de grandes cantidades de lípidos ¹⁰⁷.
- Elevado contenido de proteína (30-60 % en peso seco).
- Utilización de pigmentos u otros compuestos de interés comercial.

La biomasa de microalgas es una de las materias primas con mayor potencial para la biorrefinería, ya que puede convertirse en biocombustibles y varios coproductos (Figura 6).

Especies de microalgas como *Desmodesmus* sp., *Monoraphidium* sp., *Chlorella* sp., *Nannochloropsis* sp. muestran capacidades de acumulación de lípidos de 20-40 %, exhibiendo un rápido crecimiento y alta producción de biomasa, lo que implica una mayor productividad de lípidos, por lo que se consideran cepas candidatas prometedoras para la producción industrial de biodiesel. Se estima que con microalgas

capaces de acumular 30 % de lípidos, se podrían obtener 53 t/ha de lípidos anualmente, cifra superior a la obtenida del aceite de palma (3,62 t/ha) o de la soja (0,4 t/ha) ¹⁰⁸. La producción convencional de biodiesel a partir de microalgas consiste en concentrar la biomasa en suspensión, seguido del secado, la rotura de la pared celular y la extracción de lípidos. Posteriormente, los lípidos se transforman en biodiésel mediante transesterificación ¹⁰⁹.

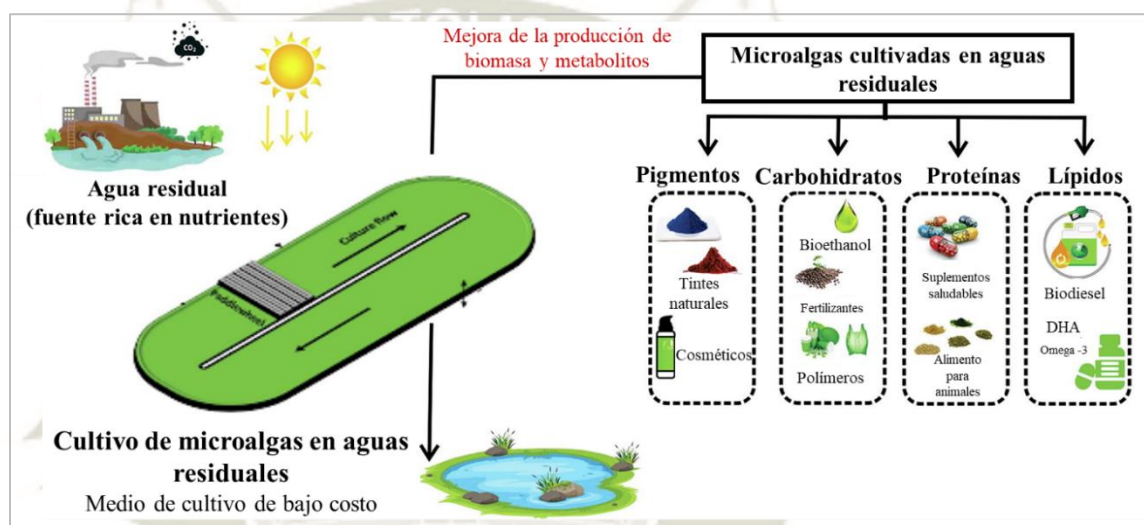


Figura 6. Biorefinería de la biomasa microalgal utilizada en el tratamiento de aguas residuales. Adaptado de Shahid et al ¹¹⁰.

La fracción no lipídica de la biomasa, que consta principalmente de proteínas y carbohidratos, también se puede transformar en varios biocombustibles, incluyendo metano y combustibles alcohólicos como el bioetanol ¹¹¹.

El uso de biomasa de microalgas rica en carbohidratos para la producción de bioetanol es ventajoso, ya que las microalgas crecen más rápido y fijan CO₂ a un ritmo mayor que las plantas terrestres ¹¹². Los carbohidratos de las microalgas se encuentran principalmente en forma de almidón (presente en los cloroplastos) y celulosa (presentes en la pared celular) ¹¹³, que no son fácilmente fermentables para la producción de etanol por microorganismos, por lo tanto, antes de la fermentación del

etanol, los polisacáridos de las microalgas deben hidrolizarse a azúcares fermentables¹¹⁴.

Microalgas como “*Chlorella*”, “*Chlamydomonas*”, “*Dunaliella*”, “*Scenedesmus*” y “*Tetraselmis*” han demostrado acumular una gran cantidad de carbohidratos (> 40 % del peso seco)¹¹⁵. Por ejemplo, muchos investigadores han informado que el género de *Chlorella* posee un alto contenido en carbohidratos, especialmente la especie de *C. vulgaris*, siendo los carbohidratos el 37-55 % de su peso seco⁶⁸.

En el estudio de Ho et al¹¹⁶ usaron la microalga “*Chlorella vulgaris*” rica en carbohidratos como materia prima para la producción de bioetanol. La hidrólisis enzimática de la biomasa de “*C. vulgaris*” FSP-E (que contuvo 51 % de carbohidratos del peso seco) dio un rendimiento de glucosa del 90.4 %. Mientras que la hidrólisis ácida trabajada con H₂SO₄ sulfúrico al 1 % también fue muy eficaz, logrando un rendimiento de glucosa de casi el 93.6 % y con ello alcanzando un rendimiento de etanol del 87.6 %.

Además de producir energía mediante biomasa de microalgas, la biomasa puede utilizarse para la obtención de otros productos. El uso de microalgas para aplicaciones agrícolas está enfocado al uso in vivo de cianobacterias, que tienen una alta capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico (N₂) y disponerlo en forma de NH₃ para la asimilación directa de las plantas. Aunque pocas microalgas tienen la capacidad de fijar este nitrógeno, su biomasa puede utilizarse como insumo ecológico para cultivos agrícolas. Además, las microalgas liberan sustancias promotoras del crecimiento como auxinas y citoquininas, mientras que también solubilizan fosfatos, y la biomasa inactiva proporciona materia orgánica nutritiva que mejora la fertilidad del suelo y la calidad de los cultivos¹¹⁷.

Dineshkumar et al¹¹⁸ evaluaron el efecto del fertilizante de microalgas marinas sobre el crecimiento y rendimiento del maíz “*Zea mays L.*”. Las plantas de maíz se cultivaron en suelo suplementado con dos microalgas marinas “*Chlorella vulgaris*” y “*Spirulina platensis*”. junto con estiércol de vaca durante 75 días en condiciones de invernadero. El tratamiento con microalgas aumentó el rendimiento del crecimiento

en la etapa temprana de crecimiento y mejoró las características de rendimiento, además de aumentar la germinación de las semillas.

1.7 *Chlorella vulgaris*

Una de las microalgas más destacables es la microalga eucariota verde *C. vulgaris*, que pertenece a la siguiente clasificación científica:

Dominio: Eukaryota,

Reino: Protista,

División: Chlorophyta,

Clase: Trebouxiophyceae,

Orden: Chlorellales,

Familia: Chlorellaceae,

Género: Chlorella,

Especie: Chlorella vulgaris.

Así, Martinus Willem Beijerinck, un investigador holandés, la descubrió por primera vez en 1890 como la primera microalga con un núcleo bien definido ¹¹⁹.

1.7.1 Morfología

La morfología de la microalga "*Chlorella vulgaris*" se puede observar en la Figura 7 y se explica a continuación:

La pared celular de la microalga "*Chlorella vulgaris*" es la principal defensa contra los bióticos y factores abióticos de las microalgas. Al comienzo de la formación de la pared celular, su grosor es de aproximadamente 2 nm y a medida que las microalgas maduran, el grosor aumenta hasta alcanzar un grosor de 21 nm ¹²⁰.

Las mitocondrias, son las encargadas de llevar a cabo los procesos metabólicos con los que las microalgas obtendrán la energía necesaria para llevar a cabo todos los procesos de crecimiento.

Contiene un sólo cloroplasto que está compuesto por fosfolípidos y consta de dos membranas ¹²¹. Dentro de los cloroplastos se encuentran los tilacoides donde se encuentra la clorofila, con los que es posible captar energía a través de la radiación y que es utilizada por el organismo para crear su propio alimento.

C. vulgaris tiene una forma esférica definida y la cantidad de clorofila y pigmentos que contienen permite observar las células vivas que mantienen intacta su pared celular al microscopio. En su medio de crecimiento tiene una organización tanto aislada como individual, además de ser capaz de formar colonias con un máximo de hasta 64 células. A veces puede agruparse en racimos de tal manera que pueda crear un ambiente favorable para su crecimiento; sin embargo, se ha observado que este tipo de organización puede ser favorable para la precipitación de las microalgas y así depurarla del medio de cultivo para luego darle una utilidad.

Además de lo anterior *C. vulgaris* es un microorganismo que no tiene estructuras celulares que le permitan movilidad en su medio de crecimiento ¹²².

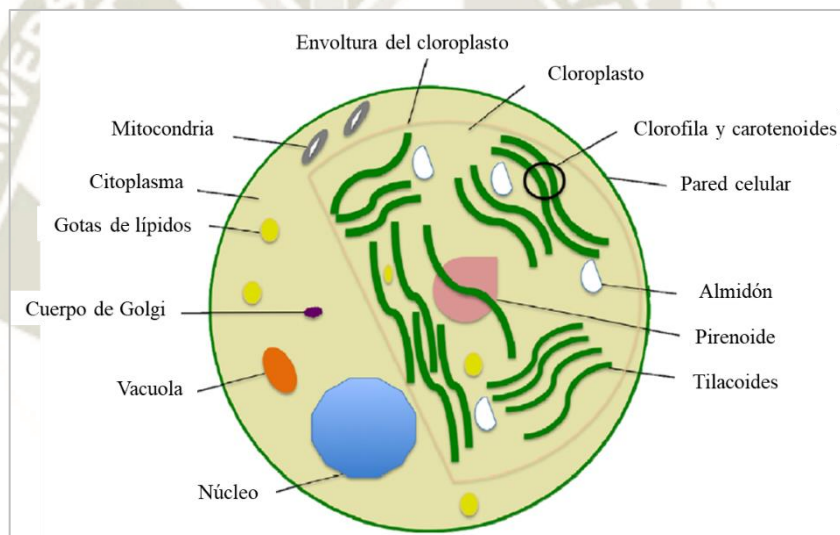


Figura 7. Esquema de la estructura morfológica de “*C. vulgaris*”.
Adaptado de Safi et al ¹²¹.

1.7.2 Reproducción

El tipo de reproducción de las microalgas es asexual y es por autoesporulación que tarda alrededor de 24 horas en realizar su división. La división celular consta de 6 pasos, que incluyen:

- a) Aumento del tamaño celular.
- b) Formación de la pared celular interna para la célula hija.

- c) División del cloroplasto en 2.
- d) Segunda división de los cloroplastos para formar 4.
- e) Formación y maduración de la pared celular hija. División de las 4 células nuevas.
- f) Rotura celular de la pared vieja para la liberación de las 4 células hijas ¹²¹.

Es importante mencionar que este proceso se lleva a cabo siempre que la célula se encuentre en condiciones favorables de crecimiento ya que si es sometida a estrés puede tener un mayor tiempo de crecimiento.

1.7.3 Composición química

a) Proteínas

La composición proteica total en *C. vulgaris* representa entre 42-58 % del peso seco en la biomasa generada ¹²¹.

Entre los aminoácidos que se han caracterizado en la cinética de crecimiento de *C. vulgaris* se encuentran: ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutámico, glicina, alanina, cisteína, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, histidina, lisina, arginina, triptófano, ornitina y prolina, donde el ácido glutámico es el que se sintetiza con mayor abundancia seguido del ácido aspártico con una concentración de 13.7 g /100 g de proteína y 10.94 g/100 g de proteína respectivamente ¹²³.

b) Lípidos

Constituyen del 5 al 40 % del peso seco en la biomasa, siendo principalmente glicolípidos, ceras, hidrocarburos, fosfolípidos y ácidos grasos. Cuando *C. vulgaris* crece en un ambiente desfavorable, se favorece la producción de lípidos, reportando hasta un 58 % de la composición total de las microalgas, ubicadas entre el espacio de los tilacoides en los cloroplastos ¹²⁴.

c) Carbohidratos

Están presentes en forma de almidón y celulosa, así como algunos azúcares reductores. El almidón se encuentra en los cloroplastos que consisten principalmente en amilosa y amilopectina; la celulosa forma parte de la pared celular de *C. vulgaris* ¹²⁵.

d) Pigmentos

Entre los pigmentos más abundantes en *C. vulgaris* se encuentra la clorofila, que constituye del 1 al 2 % del peso seco de la biomasa. Además de estos pigmentos, también existe la presencia de carotenoides que pertenecen al grupo de metabolitos secundarios llamados terpenos. Entre los principales pigmentos que se han identificado en *C. vulgaris* se encuentran: β -carotenos, astaxantina, cantaxantina, luteína, clorofila a y b, feofitina y violoxantina ¹²⁶.

1.8 Parámetros fisicoquímicos de calidad de las aguas

1.8.1 DQO

La prueba de la demanda química de oxígeno (DQO) es ampliamente usada como una forma de medir la concentración de materia orgánica en los residuos domésticos e industriales. Esta prueba permite medir en un residuo, la cantidad total de oxígeno que se requiere para la oxidación de la materia orgánica a dióxido de carbono y agua. La prueba se basa en que todos los compuestos orgánicos, con unas pocas excepciones, pueden ser oxidados por la acción de agentes oxidantes fuertes en condiciones ácidas. Una de las principales limitaciones de la prueba de la DQO es la imposibilidad para diferenciar entre materia biológicamente oxidable y materia orgánica biológicamente inerte ¹²⁷.

1.8.2 DBO

El ensayo mide el oxígeno molecular utilizado durante un periodo de incubación específico para la degradación bioquímica del material orgánico (demanda carbonada) y el oxígeno usado para oxidar el material inorgánico (Ej. sulfuros e hierro ferroso). Además, también se puede cuantificar la cantidad de oxígeno empleada para oxidar las formas reducidas de nitrógeno (demanda nitrogenada), a menos que su oxidación sea prevenida con la adición de un inhibidor.

Los métodos usualmente empleados pueden medir el oxígeno consumido en un periodo de 5 días (DBO₅), el oxígeno consumido luego de 60-90 días de incubación (DBO última) y el consumo continuo de oxígeno (método respirométrico) ¹²⁷.

1.8.3 Biodegradabilidad DBO/DQO

La relación entre la DBO y la DQO es conocida como factor de biodegradabilidad (DBO/DQO); parámetro que aporta información sobre las características biodegradables de la materia orgánica contenida en la muestra. Puesto de la DQO presenta un valor superior al de la DBO, este valor oscilará entre 0 y 1. Si los compuestos presentes en el agua son altamente biodegradables el valor se aproximará a 1, mientras que si estos compuestos orgánicos son poco biodegradables (celulosa, lignina, taninos, etc.) el valor se aproximará a 0. De esta manera, este parámetro se convierte en fundamental a la hora de decidir el sistema de tratamiento más adecuado para el agua residual:

- 0,4: se recomiendan sistemas biológicos como lodos activados.
- $0,2 \leq 0,4$: se deben usar sistemas biológicos como película fija.
- $< 0,2$: aplicación de procesos fisicoquímicos ¹²⁷.

1.8.4 Sólidos

Los sólidos se refieren al material en suspensión o disuelto (orgánico y/o inorgánico) en una muestra de agua natural o de desecho, que puede afectar su calidad desde diferentes puntos de vista. Las aguas con un alto contenido de sólidos disueltos generalmente tienen una palatabilidad baja, pudiendo inducir una reacción fisiológica desfavorable en el consumidor.

- Sólidos totales (ST) es el término aplicado al material de residuo luego de la evaporación de la muestra y su secado posterior a una temperatura definida. Los ST incluyen a los sólidos suspendidos totales (SST) y los sólidos disueltos totales (SDT).
- Sólidos disueltos (SD) es la porción de sólidos que pasa a través de un filtro de $2,0 \mu\text{m}$ (o menor) de tamaño de poro. Sólidos suspendidos (SS) es la porción que queda retenida sobre el filtro.
- Sólidos fijos (SF) es el término aplicado al residuo de los sólidos totales después de su secado bajo condiciones particulares. El peso perdido luego de calcar la muestra es llamado sólidos volátiles (SV).

- Sólidos sedimentables es el término aplicado al material que precipita en una muestra de agua dentro de un lapso de tiempo determinado ¹²⁷.

1.8.5 pH

El término pH es utilizado casi universalmente para expresar la intensidad de la condición ácida o alcalina de una solución.

El pH de un agua se debe sobre todo al equilibrio carbónico y a la actividad vital de los organismos acuáticos ¹²⁷.

1.8.6 Nitrógeno

Entre las aplicaciones del análisis de nitrógeno en las aguas se pueden mencionar las siguientes:

- Indicador de la calidad sanitaria: las aguas potables con alto contenido de nitratos, por ejemplo, usualmente causan metahemoglobinemia en niños. Debido a esto, el contenido de NO_3^- en este tipo de agua ha sido regulado a 10 mg/L por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América.
- Fuente de nutrientes: en los sistemas de tratamiento biológico para las aguas residuales es importante saber si el afluente contiene suficiente nitrógeno para los organismos vivos que se emplean en la planta de tratamiento.
- Problemas de contaminación: puede producir eutrofización de los cuerpos de aguas, generando problemas ambientales como: disminución del oxígeno disuelto, aparición de colores y olores desagradables, efectos tóxicos sobre los organismos acuáticos, proliferación de organismos indeseables, producción de sustancias tóxicas, entre otros.
- Control de procesos de tratamiento biológico: los análisis de las distintas formas de nitrógeno funcionan como indicadores de la eficiencia de estos sistemas de tratamiento al mostrar la estabilización efectiva de la materia orgánica ¹²⁷.

1.8.7 Fósforo

Uno de los principales problemas causados por el fósforo en los ecosistemas de aguas naturales es la eutrofización; fenómeno generado, al igual que en el caso del nitrógeno, por un incremento en su concentración ¹²⁷.

1.8.8 Aceites y grasa

El contenido de aceites y grasas en los residuos domésticos, en algunos residuos industriales y en los lodos, es de una consideración importante en la manipulación y el tratamiento de estos efluentes para su disposición final.

Los residuos de la industria cárnica, especialmente de las grasas duras que provienen de mataderos de ovejas y reses, disminuyen severamente la capacidad de transporte de las alcantarillas. Estas situaciones, otros factores relacionados con el tratamiento o la disposición definitiva han servido como base para establecer normas y reglamentos que controlan la descarga de los materiales grasos a los sistemas de alcantarillado o a las aguas receptoras, y han obligado a la instalación de equipos de tratamiento en muchas industrias para recuperar la grasa o el aceite antes de que se autorice la descarga ¹²⁷.

1.8.9 Turbidez

La turbidez del agua está producida por la presencia de diferentes partículas en suspensión o de tipo coloidal como arcillas, lodo, herrumbre, materiales orgánicos e inorgánicos finamente divididos, algas, bacterias u otros microorganismos. La presencia de esta materia particulada no permite la transmisión de luz en línea recta a través de la muestra de agua, absorbiéndose o dispersándose, lo cual da lugar al aspecto turbio ¹²⁷.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y METODOLOGÍA

2.1 Lugar de ejecución

La etapa de experimentación se realizó en los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María pertenecientes al pabellón F, número 405 y 406, algunas pruebas como la determinación de la distribución del tamaño de partícula y las mediciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en el laboratorio F-402.

2.2 Materiales

2.2.1 Muestras y/o unidades biológicas

- La microalga "*Chlorella vulgaris*" se obtuvo del banco de microalgas disponible en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Católica de Santa María (Arequipa, Perú).
- Las aguas residuales de matadero de aves de corral (ARMA) se obtuvieron de una industria avícola localizada en la región de Arequipa en Perú.

2.2.2 Material de laboratorio

Probetas, picetas, matraces, botellas de vidrio, placas petri, pinzas, tubos de ensayo, pipetas, micropipetas, tips para micropipetas y pipetas, fioles, probetas, espátula, crisoles, motores de aireación, lámparas LED, tubos de vidrio, asa de kolle, asa de Drigalski, pera de decantación, bureta, soporte universal, botellas tipo Winkler,






2.2.3 Insumos y reactivos químicos



Ácido sulfúrico (95- 97 %), hidróxido de sodio, ácido clorhídrico (37 %), kit Spectroquant® para la determinación de Nitrógeno (total), kit Spectroquant® para la determinación de Fosfatos (o-fosfatos y fósforo total), medio BBM compuesto de NaNO_3 (0.25 g/L), MgSO_4 (0.075 g/L) NaCl (0.025 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.025 g/L), K_2HPO_4 (0.075 g/L), KH_2PO_4 (0.175 g/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.00882 g/L), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.00144 g/L), MoO_3 (0.00071 g/L), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.00157 g/L), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

(0.00049 g/L), H_3BO_3 (0.01142 g/L), EDTA (0.05 g/L), KOH (0.031 g/L), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.00498 g/L), H_2SO_4 (0.001mL/L).

2.2.4 Equipos e instrumentación.

Equipo	Marca	Foto
Bombas peristálticas YZ1515x	Longer Pump	
Espectrofotómetro GENESYS™ 180 UV-Vis	Thermo Fisher Scientific	
Balanza analítica Adventurer	OHAUS	
Estufa de secado y esterilización Conterm, analógica	J.P. SELECTA	
Digestor TR 320	Spectroquant	

3510 pH metro	Jenway	
Celdas rectangulares de vidrio 10 mm	Spectroquant	
Celdas rectangulares de cuarzo Spectrosil 10 mm	VWR	
Centrífuga PLC-05	Gemmy Industrial Corporation	
Analizador de tamaño de partícula	DLS 3690 Malvern analytical	
Autoclave Wisd WAC – 60	WITEG Labortechnik	

Cámara de extractora de gases, fabricación nacional	HNG	
Membrana tubular de un sólo canal (Al_2O_3) con (tamaño de poro $3\ \mu\text{m}$)	Inopor	

Adicionalmente, se utilizó el fotobiorreactor tipo *airlift* de tubo concéntrico de bucle interno (4.5L), el mismo que fue construido en el desarrollo de esta investigación (Figura 8).



Figura 8. Fotografía del fotobiorreactor de tubo concéntrico de bucle interno.

2.3 Metodología

2.3.1 Obtención y cultivo de la microalga "*Chlorella vulgaris*"

La microalga "*Chlorella vulgaris*" se obtuvo del banco de microalgas disponible en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Católica de Santa María (Arequipa,

Perú) esta se identificó microscópicamente por las características de la cepa. Las microalgas fueron cultivadas en 250 mL de Medio Bold's Basal – BBM¹²⁸ a 25 °C bajo una luz blanca con iluminación continua a 440 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$ densidad de flujo de fotones. Se realizó una recta de calibración que permitió relacionar la absorbancia con la concentración de la microalga. La lectura de las absorbancias se realizó a 685 nm, longitud de máxima absorción determinada por barrido espectral en un espectrofotómetro UV/VIS (modelo GENESYS 180, Thermo Scientific). Las muestras se prepararon utilizando alícuotas de 20 mL diluidas con agua destilada para dar un rango de 0.089-1.480 absorbancia y las diluciones obtenidas a un volumen conocido se dejaron en la estufa a 70°C hasta alcanzar un peso constante. Finalmente, los datos de absorbancia y concentración se relacionaron a través de una regresión lineal, conforme a la Figura 9.

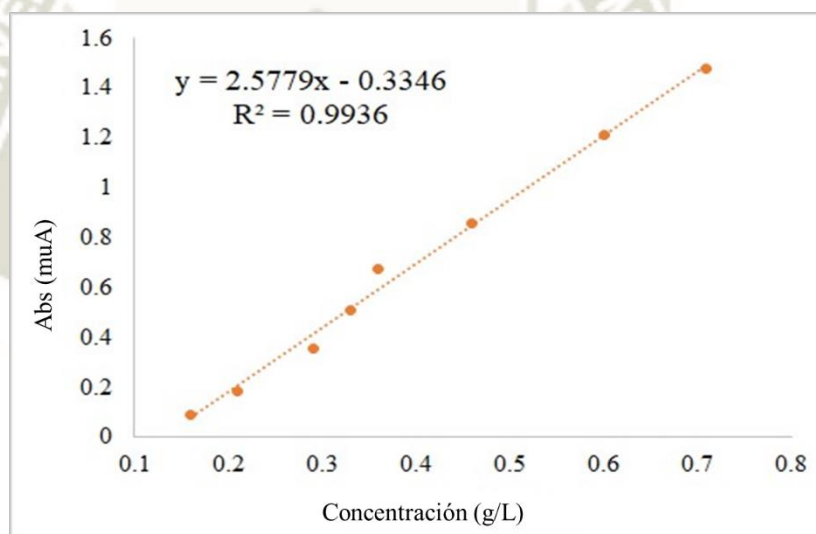


Figura 9. Recta de calibración de la microalga “*Chlorella vulgaris*”

2.3.2 Caracterización de aguas residuales de matadero de aves de corral (ARMA)

Las ARMA se filtraron con un colador para eliminar las partículas gruesas. Las aguas residuales filtradas se caracterizaron en la demanda química de oxígeno total (DQO_T), la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅), los sólidos suspendidos totales (SST), y la turbidez se determinaron según el método estándar para la caracterización de aguas

residuales APHA ¹²⁹. El aceite y la grasa se determinaron según el método ASTM D3921 ¹³⁰. El nitrógeno (total), fosfatos (o-fosfatos y fósforo total) utilizando un Kit comercial de Spectroquant® (Merck, Alemania).

2.3.3 Precipitación ácida de ARMA

Los experimentos se realizaron usando 800 mL de volumen de ARMA (pH inicial entre 6-7) en una probeta graduada (1000 mL). Las muestras fueron acidificadas agregando 0.25 M de ácido sulfúrico hasta alcanzar pH de 2, 3, 4, 5 y 6. Posteriormente se mantuvieron estáticas durante 30 min para la sedimentación de partículas. Los sobrenadantes se recuperaron mediante una bomba peristáltica y en la fracción sobrenadante se analizaron los parámetros: demanda química de oxígeno (DQO), y turbidez según los métodos indicados en el apartado 2.3.2.

Las fracciones sedimentadas se centrifugaron y secaron en un horno a 60 ° C hasta alcanzar un peso constante y luego se analizaron en su composición proximal a través de los siguientes métodos: proteínas por el método Kjeldahl ¹³¹, aceites y grasas por gravimetría después de extracción Soxhlet NTP 209.263, ¹³² y cenizas por método gravimétrico NTP 209.265 ¹³³ y la fracción de carbohidratos por diferencia con relación a los otros componentes. Los resultados se expresaron en porcentaje en base seca.

En el sobrenadante también se realizó el análisis microbiológico a fin de determinar cualitativamente la carga microbiana en cada sobrenadante obtenido después de la precipitación ácida. El agua residual de matadero de aves de corral tratada con precipitación ácida (TARMA) se diluyó 100 veces y luego se cultivó en placas que contenían medio agar de papa y dextrosa (PDA) y luego se incubaron en una estufa a 35 ° C por 24 h.

2.3.4 Cultivo de microalgas a diferentes pH y dilución de TARMA

Las microalgas se cultivaron en matraces Erlenmeyer utilizando 250 mL del agua residual de matadero de aves tratadas previamente con precipitación ácida (TARMA) a un pH de 4. En el primer caso, se estudió el efecto del pH (pH 4, 5 y 6). El pH se ajustó mediante la adición de NaOH 0,1 M, y se inoculó 10 mL de microalgas a cada uno.

En el segundo caso, se estudió el efecto de la dilución del TARMA ajustado a un pH 6 (25 %, 50 %, 75 % y 100 %) mediante la adición de cantidades adecuadas de agua destilada. En cada prueba se inoculó 10 mL de microalgas, alcanzando concentraciones de 150 – 300 mg/L de microalgas cada reactor.

Los experimentos se llevaron a cabo hasta un máximo de 68 h. En ambos casos, los experimentos se evaluaron a 25 °C bajo iluminación continua de luz LED blanca ($440 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de densidad de flujo de fotones). Las muestras fueron obtenidas periódicamente para analizar la concentración de biomasa, la demanda química de oxígeno (DQO) y el pH.

2.3.5 Cultivo de microalgas en TARMA - proceso por lotes

El TARMA se utilizó como medio para el cultivo de microalgas en un fotobiorreactor de tubo concéntrico de bucle interno (350 mm x 150 mm, 5 L). El proceso se llevó a cabo utilizando 4.5 L de TARMA a un pH inicial de 6 y una concentración inicial de microalgas de 250 mg/L en el reactor.

El experimento se realizó durante 72 h a 25-27 °C con iluminación continua ($440 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de densidad de flujo de fotones) y suministro constante de aire al reactor (0.2 vvm) para la homogeneización el medio. Durante el proceso, las muestras se obtuvieron periódicamente para analizar la concentración de microalgas, la demanda química de oxígeno (DQO) y el pH. A su vez bajo las mismas condiciones se evaluó el crecimiento de la biomasa en medio BBM y TARMA por 90 h.

2.3.6 Cultivo de microalgas en TARMA - proceso continuo

El TARMA también se utilizó para el cultivo de microalgas en modo continuo (Figura 10). El proceso se inició en proceso por lotes como se describe en la sección 2.3.5 durante 48 h. Luego, se inició el proceso continuo, el cual empleó una bomba peristáltica para alimentar con TARMA (pH = 6) al reactor a un flujo constante de 0.85 mL/min y un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 3.4 días hallados a través de la siguiente fórmula.

$$\mu_{\max} = 0.0151 \text{ h}^{-1}$$

$$D = 0.8 \times \mu_{\max}$$

$$D = 0.01208 \text{ h}^{-1}$$

$$TRH = \frac{1}{D} = 82.78 \text{ h} = 4966.88 \text{ min} = 3.4 \text{ días}$$

$$VT = 4200 \text{ mL}$$

$$Q = \frac{VT}{TRH} = \frac{4200 \text{ mL}}{4966.88 \text{ min}} = 0.8456 \text{ mL/min}$$

Dónde: Velocidad máxima de crecimiento (μ_{\max}), dilución (D), volumen de trabajo (VT), flujo de alimentación (Q).

El proceso continuo se realizó durante 207 h a 25 °C bajo iluminación continua ($440 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ de densidad de flujo de fotones) y suministro de aire constante (0.2 vvm). Para mantener constante el volumen, el exceso era removido del reactor por la línea de salida, de donde se recolectaban muestras periódicamente para analizar la biomasa de microalgas, la demanda química de oxígeno (DQO) y el pH.

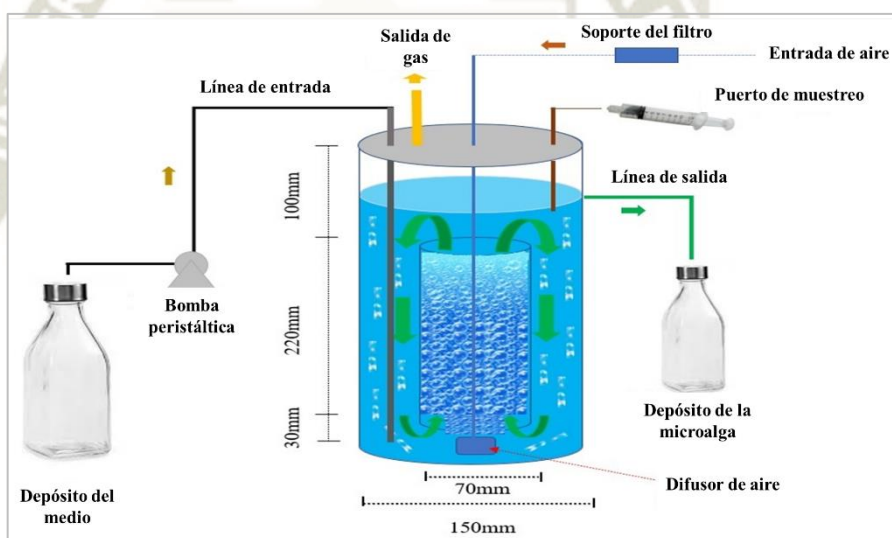


Figura 10. Representación esquemática del sistema continuo usado en el cultivo de “*Chlorella vulgaris*” en ARMA.

Adicionalmente, se incorporó un tratamiento preliminar para la separación de microalgas mediante microfiltración (Figura 11) utilizando una membrana cerámica de Al_2O_3 (7 mm x 250 mm) con 3 μm de tamaño de poro en el reservorio de microalgas. El filtrado obtenido se analizó en DQO, DBO_5 y turbidez.

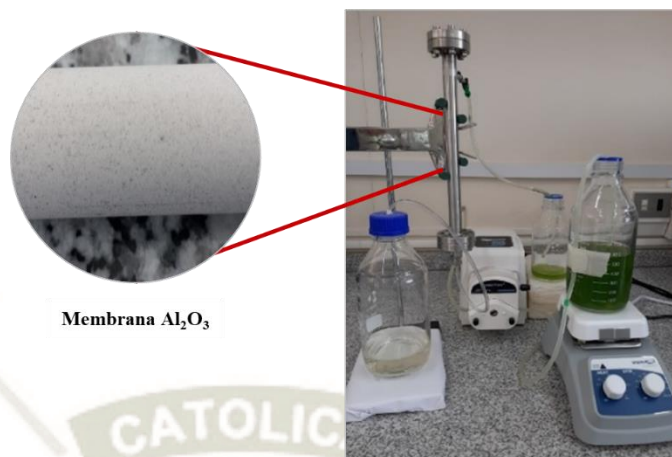


Figura 11. Fotografía del sistema de microfiltración implementado.

2.3.7 Métodos analíticos

La demanda química de oxígeno en las aguas

En el presente estudio, la demanda química de oxígeno en los efluentes fue determinado por el método colorimétrico estándar (reflujo cerrado) ¹²⁹.

Se preparó una recta de calibración de DQO desde 20 hasta 900 mg de O₂/L, a partir de la solución estándar de KHP 1000 mg de O₂/L, utilizando los volúmenes que se especifican en la Tabla 3 y aforando el volumen final (50 mL) con agua destilada:

Tabla 3. Volúmenes de solución estándar de KHP 1000 mgO₂/L para la preparación de la recta de calibración de DQO con concentraciones desde 20 hasta 900 mgO₂/L.

Patrón (mgO ₂ /L)	Volumen (mL) de solución estándar de KHP 1000 mgO ₂ /L	Volumen final (mL)
Blanco	0	50.0
20.0	1.0	50.0
50.0	2.5	50.0
100.0	5.0	50.0
200.0	10.0	50.0
300.0	15.0	50.0

400.0	20.0	50.0
500.0	25.0	50.0
600.0	30.0	50.0
700.0	35.0	50.0
800.0	40.0	50.0
900.0	45.0	50.0

Después, se organizaron los tubos de digestión de 10 mL en una gradilla. Se agitó vigorosamente la muestra y los patrones de la recta de calibración. Se vertieron 2.5 mL de muestra y/o patrón en el tubo de digestión y se aplicó el factor de dilución para las muestras. Se adicionaron 1.5 mL de solución digestora de dicromato de potasio y se mezcló ligeramente. Posteriormente se agregó también, lenta y cuidadosamente 3.5 mL del reactivo de ácido sulfúrico. Se mezcló nuevamente de forma cuidadosa el contenido de los tubos por inversión completa, dos o tres veces. Se colocaron los tubos de digestión en el bloque digestor precalentado a 150 °C. Las muestras fueron digeridas durante 2 h a 150°C. Posteriormente, se realizaron las lecturas de absorbancia (600 nm) y los resultados fueron relacionados con la concentración a través de una regresión lineal (Figura 12).

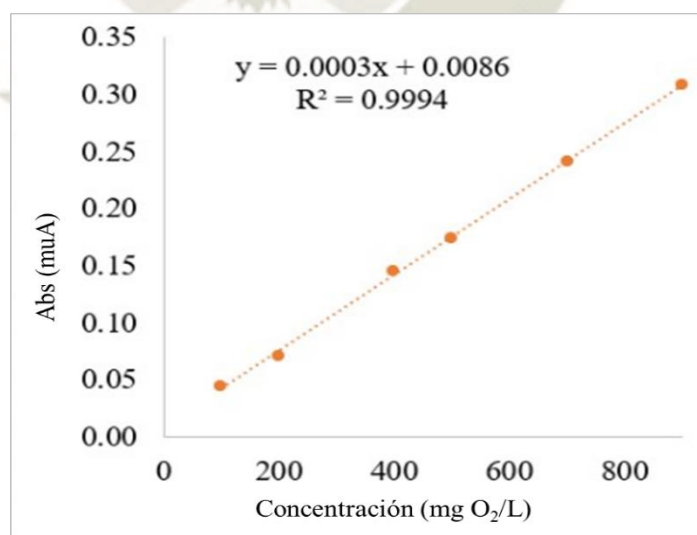


Figura 12. Recta de calibración de la demanda química de oxígeno

Distribución del tamaño de partícula

La distribución del tamaño de partícula en las muestras se midió usando un analizador de tamaño de partícula de difracción láser en un Zetasizer ¹³⁴. La turbidez de las muestras se analizó utilizando un espectrofotómetro UV-vis a 700 nm conforme Luoheng Han ¹³⁵.

Kit comercial Spectroquant® para la determinación de Nitrógeno (total)

Los compuesto orgánicos o inorgánicos que contienen nitrógeno se transforman en nitratos por el método de Koralef por tratamiento con un oxidante. Los nitratos en solución sulfúrica y fosfórica forman dimetilfenol (DMP). El compuesto 4-nitro dimetilfenol se determina fotométricamente.

Para la determinación de nitrógeno con el kit comercial mencionado, las pruebas se prepararon diluyendo 1.0 mL de la muestra con 9.0 mL de agua destilada, a esta mezcla se le agregó una microcuchara del reactivo N-1K y 6 gotas del reactivo N-2K pertenecientes al kit y se llevaron al digestor por una hora a 120°C. Posteriormente, estas muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se transfirió 1.0 mL de las mismas al tubo de reacción N. Finalmente, en el tubo de reacción N se agregó 1.0 mL del reactivo N-3K y después de agitar por unos breves instantes y dejar reposar por 10 min, las muestras se leyeron a un longitud de onda de 340 nm en el espectrofotómetro UV-Vis.

Kit comercial Spectroquant® para la determinación de Fosfatos (o-fosfatos y fósforo total)

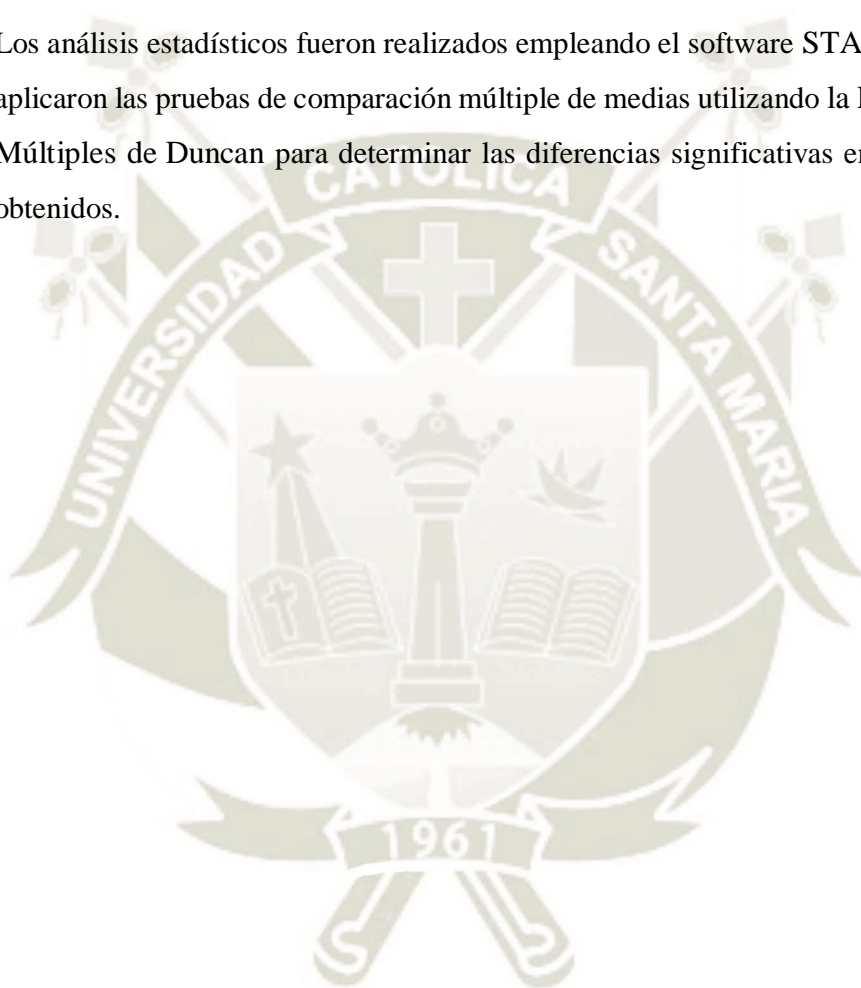
En una solución sulfúrica, los iones orto fosfato reaccionan con los iones molibdato para formar ácido molibdofosfórico. El ácido ascórbico lo convierte en azul de molibdeno haciéndolo detectable foto-colorimétricamente.

Para las pruebas de determinación de fosfatos inicialmente se pretrató 2 mL de la muestra con una dosis del reactivo P1K a 120 °C por 30 min. Posteriormente de transfirió 0.20 mL del pretratado a los tubos de reacción P y se le agregó 5 gotas del

reactivo P-2K y una dosis del reactivo P-3K hasta la disolución. Se dejó 5 min en reposo y finalmente se midió en el espectrofotómetro UV-vis a una longitud de onda 690 nm.

2.3.8 Métodos estadísticos

Los análisis estadísticos fueron realizados empleando el software STATGRAPHICS. Se aplicaron las pruebas de comparación múltiple de medias utilizando la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan para determinar las diferencias significativas entre los resultados obtenidos.



CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Propiedades fisicoquímicas de ARMA

Las características de ARMA se muestran en la Tabla 4. Como se observa, el efluente contiene altos valores de compuestos orgánicos expresados como DQO_T, nutrientes (N, P), aceite y grasa. No cumpliendo con la “Norma complementaria al Decreto Supremo N° 010-2019-VIVIENDA, Reglamento de Valores Máximos Admisibles (VMA) para las descargas de aguas residuales no domésticas en el sistema de alcantarillado sanitario” establecida por el gobierno peruano donde los valores máximos de DQO, DBO₅ y aceites y grasas son 1000, 500 y 100 mg/L respectivamente. Además, las ARMA mostraron un alto índice de biodegradabilidad ($DBO_5 / DQO = 0.76$) y un pH neutro. Los resultados coinciden con los reportados en la literatura ^{17, 20, 21}. La turbidez de ARMA fue de alrededor de 650-950 UNT, en el rango de 719 UNT informado por Basitere et al ²¹. Los valores altos de este parámetro representan un enorme problema para el proceso de tratamiento debido a la presencia de partículas coloidales muy pequeñas a grandes flóculos que incluyen arcilla, limo, materia orgánica e inorgánica finamente dividida, compuestos orgánicos coloreados solubles (por ejemplo, sangre) y microorganismos ^{136, 137}.

Teniendo en cuenta el gran volumen de efluente generado en la industria de los mataderos de aves de corral y las características del ARMA, el desarrollo de la tecnología adecuada para el tratamiento es crucial. De esta forma, el ARMA se sometió a precipitación ácida y se analizó brevemente en la siguiente sección.

Tabla 4. Características de ARMA sin tratamiento y comparación con lo reportado por la literatura previamente.

Parámetros	Unidades	Este estudio	Chavez et al ²⁰ .	Rajab et al ¹⁷ .	Bastiere et al ²¹ .
pH	-	6.84 – 7.28	6.10-7.10	6.8	6.13-7.24
Solidos totales	mg/L	2740	1082-4558	NR	NR
Solidos suspendidos totales	mg/L	NA	762–1462	835	1654

DQO total	mg/L	2185-7313	5800-11600	2711	5126
DQO soluble	mg/L	938 - 1500	NR	NR	NR
DBO ₅	mg/L	5630	4524-8700	930	2477
N total	mg/L	110 - 175	NR	153	NR
P total	mg/L	44 - 67	7.17-12.74	NR	NR
Aceite y grasa	mg/L	281-830	147-666	281	715
Alcalinidad total	mg/L	NA	7.5-12.10	160	499
Turbidez	UNT	650-950	NR	>1000	719

*Alcalinidad (como CaCO₃). NA = no analizado; NR= no reportado.

3.2 Precipitación ácida de ARMA.

Se evaluó el efecto del pH (2-7) sobre las propiedades fisicoquímicas de ARMA, los resultados se muestran en la Figura 13 y 14. Como se puede observar en la Figura 13 (a) la mayor remoción de DQO (81 %) se obtuvo en el sobrenadante a pH 4. En la Figura 13 (b) se muestra una fotografía donde se observa el volumen de sedimento generado producto de la precipitación ácida en los diferentes tubos tratados, adicionalmente se evidencia el grado de turbidez removida de forma cualitativa.

Además de la remoción de DQO por efecto de la precipitación ácida, el color y la turbidez de las aguas residuales se redujo significativamente (Figura 14), facilitando el proceso de tratamiento biológico.

La turbidez es causada por la presencia de partículas suspendidas o disueltas, este parámetro fue reducido considerablemente de 650-950 UNT a 98 UNT, a pH 4. Además, el tamaño promedio de partículas en el sobrenadante (pH = 4) fue 726 nm el cual es menor que el obtenido en ARMA sin tratar (1432 nm). La rápida sedimentación a pH <6, se puede asociar al punto isoelectrico (PI) de las proteínas disueltas en el ARMA, cuyo valor se encuentra alrededor de 4.6⁴¹, ya que el contenido de proteína corresponde al 35-70 % de la DQO total presente en el ARMA^{41, 42}. Este resultado es similar al obtenido por Bayar et al¹³⁸, donde eliminó el 73 % de la DQO de aguas residuales del matadero de aves de corral mediante el método de electrocoagulación (CD = 1 mA.cm-2, 150 rpm, 20 min y 293 K) a pH 4. De la misma forma la precipitación ácida fue más eficiente a pH 3,4 y 5 para otro tipo de aguas residuales^{139, 140}. Sin embargo, nuestro resultado difiere a lo reportado previamente por Prazeres

et al ⁷ para precipitación ácida de aguas residuales de matadero, donde la eliminación de materia orgánica, medida como DQO, aumenta en función del pH alcanzando el mejor resultado a pH 6 (97 %) y el mínimo a pH 1 (45 %).

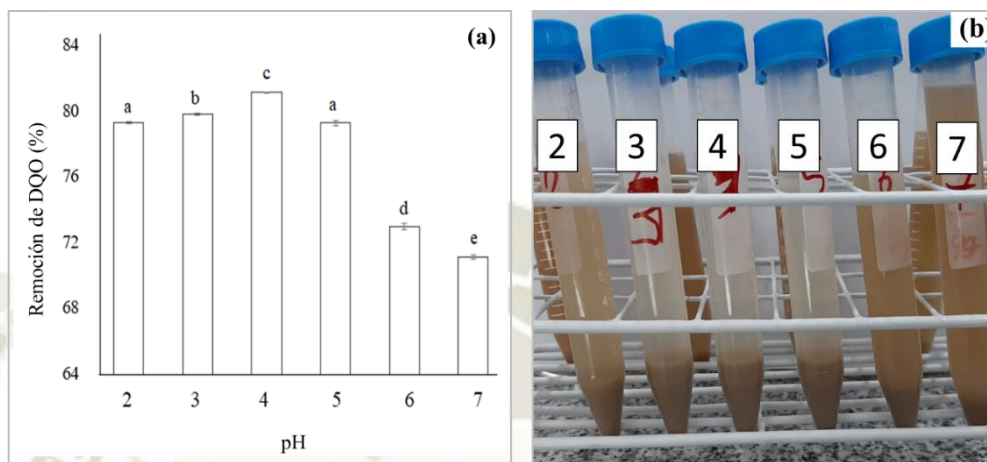


Figura 13. Resultados de la precipitación ácida (a) Remoción de DQO a diferentes condiciones de pH. (b) Fotografía de la prueba de precipitación ácida a diferentes pH (2-7). En la Figura (a): Los resultados son la media de tres repeticiones. Las diferentes letras minúsculas encima de la columna son indicativos de diferencias significativas ($p < .05$) evaluadas a través de una prueba de Duncan de rango múltiple.

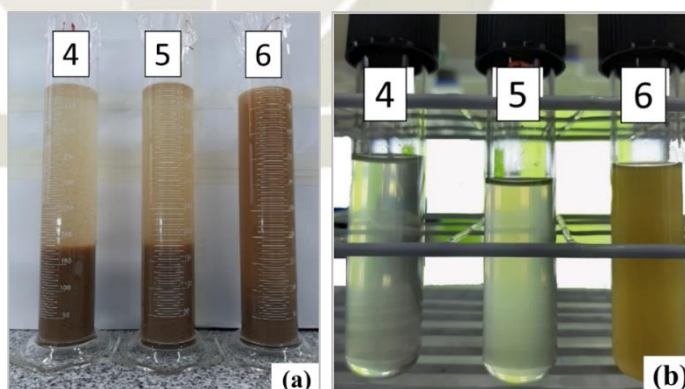


Figura 14. (a) Fotografía de la prueba de precipitación ácida de ARMA en probetas de 500 mL a pH 4, 5 y 6. (b) Fotografía del sobrenadante obtenido a pH 4, 5 y 6.

Las ARMA están altamente cargadas de materia orgánica ya que casi el 35 % de la misma corresponde a los grandes desechos flotantes resultantes de la aglomeración de grasas,

mientras que la mayor fracción (alrededor del 55 %) corresponde a sólidos en suspensión que contienen lípidos, proteínas, microbios patógenos, entre otros ⁴¹. Por tanto, en la fracción sedimentada se espera obtener un alto contenido de grasas y proteínas. En la Figura 15, se puede observar la composición proximal del lodo obtenido después de la precipitación ácida, conformado principalmente por lípidos (46 %) y proteínas (37 %), los cuales pueden ser utilizados en procesos anaeróbicos para producir biogás como residuo valioso ⁵.

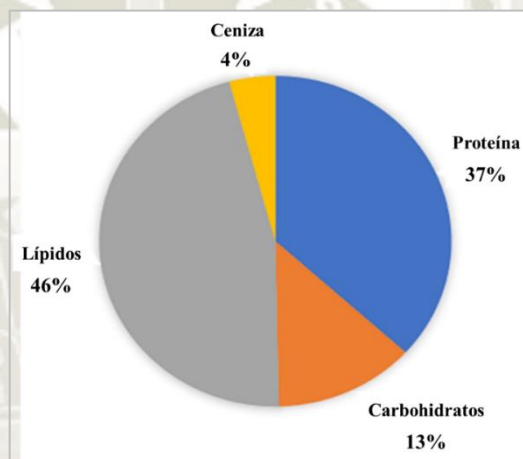


Figura 15. Composición proximal del precipitado.

El ARMA es un efluente peligroso ya que puede contener microbios patógenos como coliformes (por ejemplo *E. coli*), *salmonella* y otros ¹⁴¹. La Figura 16 muestra los resultados obtenidos del ensayo de control microbiológico donde se puede observar una reducción significativa en la carga microbiana después de la sedimentación a pH 4, la cual fue menor que la observada para pH 5, 6 y 7. La reducción puede ser asociada a la sedimentación de microorganismos junto con materia orgánica como efecto del arrastre de los sólidos suspendidos. A su vez, se sabe que un pH entre 6.5 y 7.5 se considera una condición óptima para *Salmonella* y *E coli*; sin embargo, un pH bajo afecta la supervivencia de las bacterias ¹⁴².

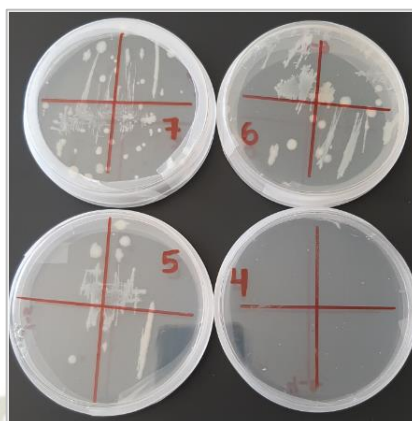


Figura 16. Fotografía de los resultados obtenidos de la prueba de control microbiológico donde se muestra la viabilidad de microorganismos cultivados en Agar PDA a 35°C.

Debido a los bajos valores de turbidez y color del sobrenadante obtenidos a pH 4, su uso como sustrato resulta adecuado para el cultivo de microalgas. En el siguiente paso, el sobrenadante obtenido después de la precipitación ácida del ARMA, renombrado como TARMA fue ajustado a pH 5 y 6, y posteriormente fue inoculado con la microalga “*Chlorella vulgaris*”; los resultados se muestran en la Tabla 5 y la Figura 17. El sobrenadante a pH inicial 6 presenta mejores condiciones como medio para el cultivo de microalgas, logrando la mayor producción de biomasa (415 mg/L) y remoción de DQO (82 %). La alta remoción de DQO se puede asociar a un rápido crecimiento de microalgas, alcanzando una concentración de microalgas 75 % mayor que la observada para pH 5. Por otra parte, el pH del medio aumentó rápidamente alcanzando valores de aproximadamente 8.5 después de 48 h iniciado el proceso. Song et al ¹⁴³ también reportaron un aumento en el pH de 7 a 9.5 en 3 días cuando cultivaron *Chlorella* en el medio BG11 modificado.

Tabla 5. Cultivo de microalgas en TARMA al 75 % y diferente pH inicial del medio.

Valores Iniciales			Valores después de 48 h.			Remoción de DQO (%)
pH	DQO (mg O ₂ /L)	Biomasa (mg/L)	pH	DQO (mg O ₂ /L)	Biomasa (mg/L)	

4.00 ± 0.1	1133 ± 101	159	4.21 ± 0.18 a	844 ± 17 a	197 ± 22 a	26
5.02 ± 0.2	1133 ± 101	159	7.48 ± 0.80 b	652 ± 71 b	237 ± 59 b	43
6.01 ± 0.1	1133 ± 101	159	8.55 ± 0.18 c	207 ± 29 c	415 ± 30 c	82

El valor informado corresponde al promedio de experimentos por triplicado ± desviación estándar (DE). Las medias dentro de una columna con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > .05$) según lo revelado por una prueba de Duncan a un nivel de confianza del 95 %.

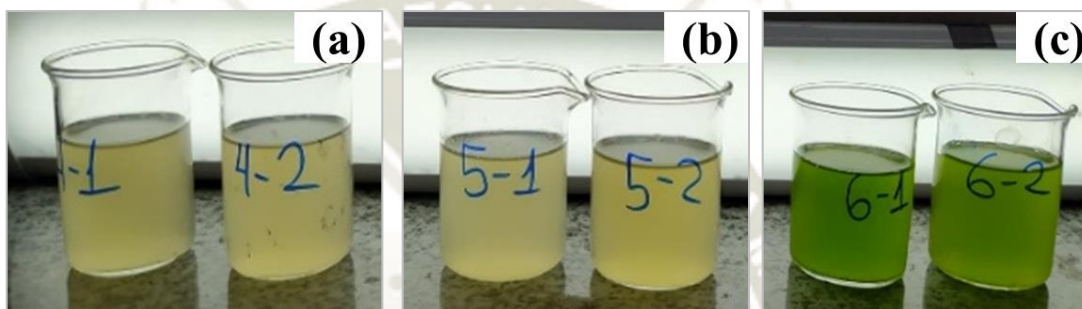


Figura 17. Fotografías del crecimiento de las microalgas en TARMA
(a) pH 4 (b) pH 5 y (c) pH 6 después de 48 h.

3.3 Cultivo de microalgas a diferentes diluciones de TARMA

El TARMA se ajustó a pH 6 y se utilizó como medio para el cultivo de microalgas a diferentes diluciones con el objetivo de evaluar la toxicidad de las aguas residuales (Tabla 6). Como se puede observar, para el medio sin dilución (DQO= 1215 mg/L), el 81 % de la DQO se eliminó en 68 h. Este valor fue menor comparado con la remoción obtenida en el medio diluido, (98-100 %). Este resultado muestra que no es necesario diluir la fracción sobrenadante de ARMA para el cultivo de microalgas. Aunque no se encuentran reportes que utilicen “*Chlorella vulgaris*” para TARMA, el resultado es cercano al obtenido para “*Chlorella pyrenoidosa*” cultivada en aguas residuales de matadero (de ganado vacuno / caprino / ovino / búfalo/porcino) ¹⁴⁴. En ese trabajo, el mejor medio para el cultivo de microalgas fue el diluido al 50 % (1714 mg/L de DQO). Una vez determinada la viabilidad de las microalgas “*Chlorella vulgaris*” para crecer en TARMA sin diluir, se realizaron experimentos en biorreactores y los resultados se muestran en la siguiente sección.

Tabla 6. Cultivo de microalgas en medio diluido a base de aguas residuales de matadero avícola tratadas con precipitación ácida (TARMA).

Dilución (%)	TARMA (mL)	Agua Destilada (mL)	Concentración de la microalga (mg/L) *	Concentración DQO (mg O ₂ /L)			Remoción del DQO * (%)
				0 h	48 h	68 h	
F-25	50	150	919 ± 0.2 a	306 ± 40 a	16 ± 2 a	-	100
F-50	100	100	968 ± 0.2 b	645 ± 42 b	133 ± 35 b	11 ± 8 a	98
F-75	150	50	1129 ± 0.1 c	838 ± 21 c	288 ± 24 c	98 ± 24 b	88
F-100	200	0	1215 ± 0.1 d	1328 ± 7 d	469 ± 30 d	258 ± 24 c	81

* Los valores fueron calculados a las 68 h. La concentración inicial de microalgas en todo el experimento fue 282 mg / L. El valor informado corresponde al promedio de experimentos por triplicado ± desviación estándar (DE). Las medias dentro de una columna con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > .05$) según lo revelado por una prueba de Duncan a un nivel de significancia del 95 %.

3.4 TARMA para cultivo de microalgas en lote seguido de proceso continuo

El TARMA ajustado a pH 6 se utilizó para el cultivo de la microalga *C. vulgaris* en proceso por lotes y continuo, utilizando un fotobiorreactor de tubo concéntrico de bucle interno (ICTB), los resultados se muestran en la Figura 18 y la Figura 19. Como se observa el valor de la demanda química de oxígeno (DQO) disminuyó en un 83 % después de 48 h del proceso (Figura 18). Adicionalmente el 58 % y el 60 % de los nutrientes fue removido en forma de nitrógeno y fósforo total, respectivamente. La considerable reducción se puede atribuir al consumo de una gran parte de los nutrientes por el co-cultivo simbiótico de microalgas "*Chlorella vulgaris*" y bacterias silvestres (*Salmonella*, *E. coli*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y otras) presentes en TARMA^{4,145}, principalmente en las primeras 48 h del proceso cuando el pH del medio estuvo entre 6 y 9; pH óptimo para el crecimiento de bacterias. Después de 48 h del proceso, el pH del medio fue superior a 9 y la DQO se mantuvo alrededor de 200 mg de O₂/L. La variación del pH por encima de 9 afectó al crecimiento bacteriano, atribuyendo la disminución de nutrientes principalmente a las microalgas. Los valores

residuales de DQO se pueden atribuir a la presencia de compuestos no solubles lentamente biodegradables y no biodegradables en TARMA ¹⁴⁶.

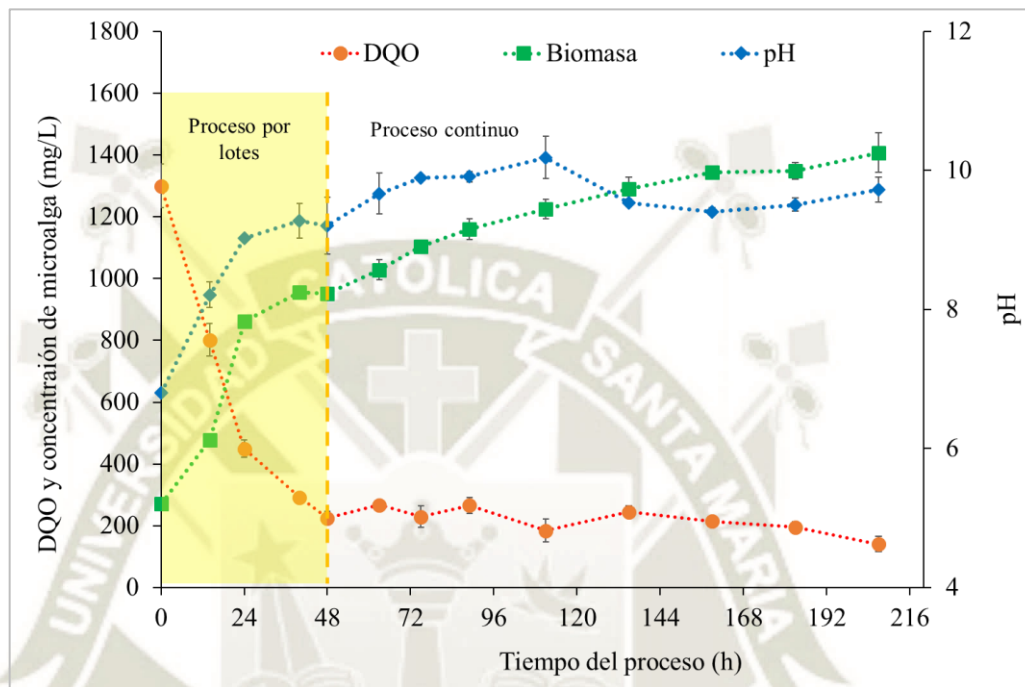


Figura 18. Perfil del desempeño de la DQO, pH y contenido de biomasa durante el tratamiento de TARMA en modo batch y continuo utilizando un fotobiorreactor tubular concéntrico tipo airlift.

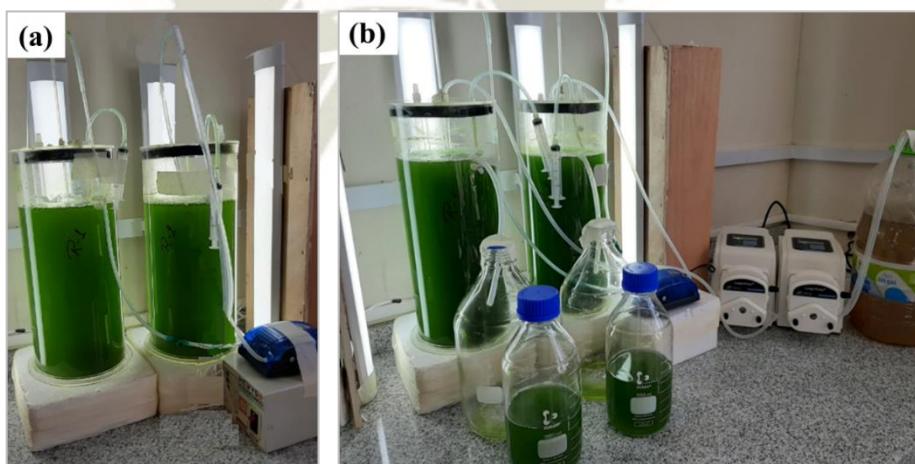


Figura 19. Cultivo de microalga utilizando TARMA (a) por lotes y (b) proceso continuo

Después de 48 h de tratamiento por lotes, se inició un proceso continuo y el resultado se muestra en la Figura 18. La DQO y el contenido de biomasa durante el proceso continuo fue de aproximadamente 200 mg/L y 1.2 g/L, respectivamente. La alimentación con TARMA (pH 6) a 0.85 mL/min (TRH de 3.4 días) conteniendo 1300 mg/L de DQO fue reducido exitosamente a 200 mg/L en el proceso continuo. Durante el proceso, el color verde característico del medio se intensificó progresivamente (Figura 20), debido a la presencia de “clorofila-a” en las microalgas como ha sido reportado previamente ¹⁴⁷.

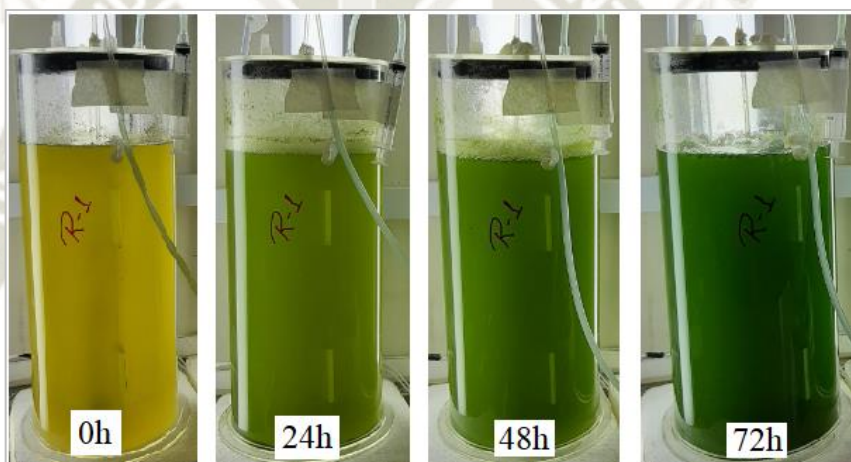


Figura 20. Perfil de crecimiento de “*Chlorella vulgaris*” durante en cultivo por lotes y continuo usando medio TARMA sin dilución.

Durante el tratamiento por lotes, se observaron cambios en el pH del medio, el cual aumentó de 6 a 8.5 en 48 h; en el modo continuo, el pH mostró una ligera variación de alrededor de 9-9.5. Se infiere que el pH del medio aumenta debido al hidróxido generado por la reducción de las moléculas de oxígeno producidas durante la fotosíntesis ¹⁴⁸ y por el consumo de CO_2 y HCO_3^- ⁷¹. Otondo et al ¹⁴⁹ también reportaron un rápido aumento del pH durante el cultivo de microalgas en proceso por lotes utilizando aguas residuales municipales como sustrato (DQO de 125 mg/L). En

ese trabajo, el pH del medio aumentó de 7 a 10 en 4 días, luego el pH se mantuvo alrededor de 10.

Finalmente, como estudio exploratorio, se incorporó una membrana tubular monocanal (Al_2O_3) (7 mm x 250 mm) de 3 μm de tamaño de poro, en la corriente de salida para la recuperación de microalgas, el resultado se muestra en la Tabla 7. Como se observa, el valor de la DQO del filtrado fue en promedio de 97 mg/L, este es levemente menor que el alcanzado en el medio antes de la filtración (alrededor de 200 mg/L), por lo que la membrana retiene principalmente las microalgas.

Sin embargo, las propiedades medidas del agua filtrada a 3 μm son ligeramente superiores a las establecidas por la legislación del gobierno peruano “DS N° 015-2015-MINAM” para la categoría de agua 3, utilizada en el riego de cultivos de tallos altos y bajos, donde los valores máximos de DQO y DBO_5 son 40 y 15 g/L, respectivamente. Por tanto, para alcanzar los valores establecidos en la legislación y poder reutilizar el agua se puede aplicar una nanofiltración posterior (tamaño de poro de 800 nm).

Por otro lado, los parámetros alcanzados después de la microfiltración cumplen con la “Norma complementaria al Decreto Supremo N° 010-2019-VIVIENDA, Reglamento de Valores Máximos Admisibles (VMA) para las descargas de aguas residuales no domésticas en el sistema de alcantarillado sanitario” establecida por el gobierno peruano donde los valores máximos de DQO, DBO_5 y sólidos suspendidos totales son 1000, 500 y 500 mg/L respectivamente

Tabla 7. *Parámetros de TARMA obtenidos después de la precipitación ácida y el filtrado después de una microfiltración del medio con microalga*

Parámetros	Después de la sedimentación ácida / antes del tratamiento biológico	Después del cultivo de microalga y microfiltración
pH	6.03	9.24
DQO (mg O_2 /L)	1482.40 \pm 415	97.01 \pm 27
DBO_5 (mg O_2 /L)	1136.00 \pm 216	41.40 \pm 8
COT (mg/L)	511.20 \pm 153	28.6 \pm 9
SST (mg/L)	77.00 \pm 22	8.00 \pm 2

N_T	122 ± 7	48 ± 3
$N-NO_3$ (mg/L)	< 0.014	< 0.014
$N-NO_2$ (mg/L)	< 0.002	< 0.002
P_T (mg/L)	18.52 ± 2	2.45 ± 0.2
Turbidez (UNT)	98.00 ± 8	5.50 ± 0.4

El valor informado corresponde al promedio de experimentos por triplicado \pm desviación estándar.

A su vez se hizo un experimento exploratorio para comparar el crecimiento de la biomasa en medio sintético (BBM) y en medio con el efluente tratado (TARMA), los resultados se muestran en la Figura 21. Las concentraciones de microalga después de 90 h resultaron ser 0.560 g/L en medio BBM y aproximadamente 1.2 g/L en TARMA. Demostrando ser TARMA un medio 214 % más efectivo para el crecimiento de la microalga “*Chlorella vulgaris*” que el medio sintético BBM. Estos resultados están en concordancia con el estudio reportado por Bhatnagar et al ⁴⁸ donde trabajaron con un cultivo mixótrofico de *Chlamydomonas globosa*, *Chlorella minutissima* y *Scenedesmus bijuga* con extracto de desechos de aves de corral como medio de crecimiento y registró hasta un 180 % más de crecimiento de biomasa en comparación con el medio de crecimiento estándar BG11. Sin embargo, al momento de la realización de este estudio no se han reportado trabajos donde se compare el crecimiento de la microalga “*Chlorella vulgaris*” en aguas residuales de matadero de aves y medio sintético BBM.

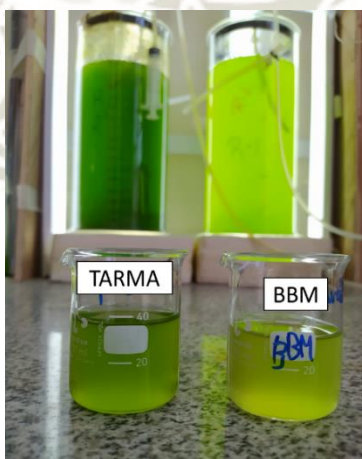


Figura 21. Fotografía de los reactores con TARMA y BBM luego de 90 h.

Con base en el resultado obtenido, un nuevo proceso para el tratamiento de ARMA fue propuesto (Figura 22). Las ARMA se recolectan en un tanque y se someten a precipitación ácida agregando ácido sulfúrico hasta un pH 4, el sobrenadante se separa y se ajusta a pH 6 sólo para el cultivo de microalgas en proceso por lotes y luego el agua residual (pH 4) puede alimentar directamente al biorreactor en etapa continúa permitiendo controlar el pH del medio a <9 . Adicionalmente, según el resultado mostrado en la Figura. 13A, el pH de ARMA no necesariamente necesita reducirse a pH 4, es posible trabajar en un rango de pH entre 4-5, con el fin de reducir el consumo de ácidos y álcalis en el proceso. Finalmente, las estrategias propuestas son eficientes para mitigar el impacto negativo de ARMA en el medio ambiente principalmente en países en desarrollo como Perú. Por otro lado, el uso de ARMA como sustrato para el cultivo de microalgas es una opción adecuada una vez que la biomasa obtenida pueda ser valorizada en la producción de bioenergía (por ejemplo, biodiesel o bioetanol) o biofertilizante y el material sedimentado pueda ser usado para producir metano en un biodigestor anaeróbico.

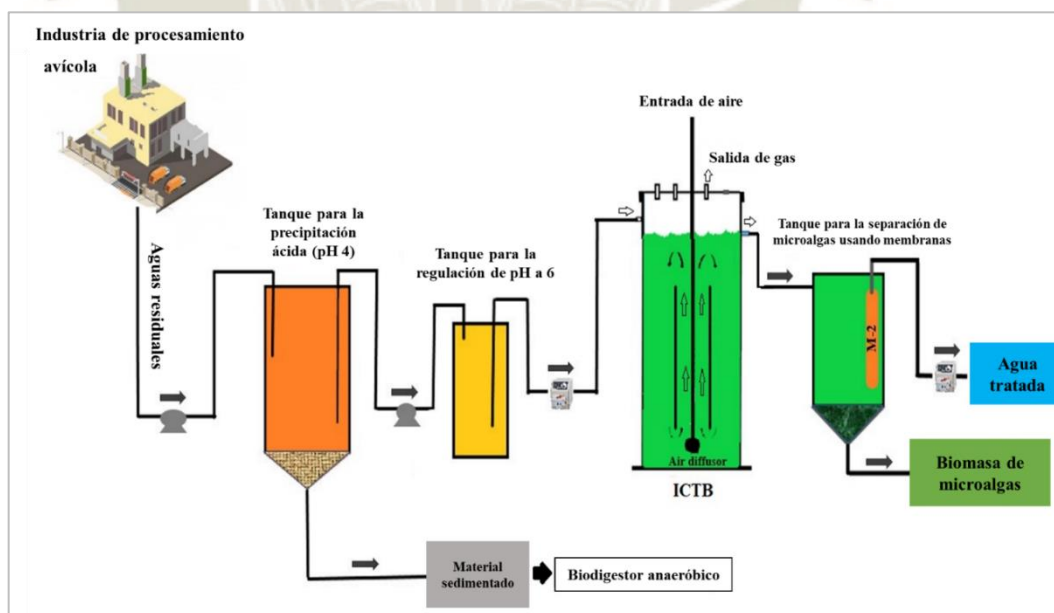


Figura 22. Proceso propuesto basado en la precipitación ácida y el cultivo de microalga para el tratamiento de ARMA. En la figura “M-2” corresponde a un módulo de ultrafiltración.

CONCLUSIONES

1. El tratamiento fisicoquímico de efluente avícola y el subsecuente uso para el cultivo de microalgas "*Chlorella vulgaris*" en biorreactores operando en modo continuo resultó ser un método adecuado permitiendo la remoción de compuestos orgánicos y la obtención de biomasa microalgal.
2. Las aguas residuales de matadero de aves estudiadas contenían altos valores de compuestos orgánicos expresados como DQO_T (2185-7313 mg/L), N_T (110-175 mg/L), P_T (44-67 mg/L), aceite y grasa (281-830 mg/L), los cuales excedían los valores máximos establecidos según la normativa peruana para las descargas de aguas residuales no domésticas. A su vez las ARMA mostraron un alto índice de biodegradabilidad (DBO₅/ DQO = 0.76) y un pH neutro.
3. La precipitación ácida permitió una reducción de la turbidez, color y DQO del efluente. Se encontró que el pH óptimo para la precipitación ácida fue el pH 4 donde hubo una mayor reducción de la turbidez de 650-950 UNT a 98 UNT y una mayor remoción del DQO (81 %).
4. La microalga "*Chlorella vulgaris*" demostró trabajar mejor en el TARMA ajustado a pH 6, logrando la mayor producción de biomasa (415 mg/L) y remoción de DQO (82 %). También fue capaz de sobrevivir y disminuir el DQO (81%) del TARMA sin dilución como medio de cultivo.
5. El tratamiento en modo lotes y continuo redujo más del 83 % de la DQO residual, adicionalmente el 58 % y el 60 % de los nutrientes fue removido en forma de nitrógeno y fósforo total, respectivamente.
6. La filtración por membranas retuvo principalmente las microalgas, el valor de la DQO y DBO₅ del agua filtrada fue en promedio de 97 mg/L y 41 mg/L respectivamente, sin embargo, las propiedades medidas fueron ligeramente superiores a las establecidas por la legislación del gobierno peruano para el agua de categoría 3, que permitiría su reutilización en riegos de cultivos.

RECOMENDACIONES

1. Para la implementación de este proyecto en la industria avícola se recomienda estudios con mayor volumen de trabajo con el objetivo de evaluar el proceso desde el punto de vista económico y ambiental, asimismo la evaluación de parámetros de funcionamiento en el fotobioreactor como la intensidad de luz, temperatura y fotoperiodo con la finalidad de optimizar este escalamiento.
2. A las personas interesadas en seguir con esta investigación se sugiere la inclusión de un proceso de nanofiltración con el propósito de reducir aún más el DQO para la reutilización de estas aguas en riego con el objetivo de un proceso de descarga cero. También se recomienda después de la precipitación ácida la utilización de la microalga "*Chlamydomonas acidophila*" capaz de remover nutrientes a pH ácido.
3. Para la academia se recomienda realizar un análisis composicional de las microalgas a fin de dar una aplicación adecuada a la biomasa generada, se sugiere mezclar el sedimento obtenido en la precipitación ácida con la biomasa obtenida para la producción de biometano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Weerasekara A, Jenkins S, Abbott L, Waite I, McGrath J, Larma I et al. Microbial phylogenetic and functional responses within acidified wastewater communities exhibiting enhanced phosphate uptake. *Bioresource Technology*. 2016;220:55-61.
2. Baker B, Mohamed R, Al-Gheethi A, Aziz H. Advanced technologies for poultry slaughterhouse wastewater treatment: A systematic review. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 2020; 1-20.
DOI: <https://doi.org/10.1080/01932691.2020.1721007>.
3. Aves. Minagri.gob.pe. 2019. Disponible en: <https://www.minagri.gob.pe/portal/40-sector-agrario/situacion-de-las-actividades-de-crianza-y-produccion/297-aves?start=3>.
4. Avula R, Nelson H, Singh R. Recycling of poultry process wastewater by ultrafiltration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2009;10(1):1-8.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.08.005>
5. Terán Hilaes R, Atoche-Garay D, Pinto Pagaza D, Ahmed M, Colina Andrade G, Santos J. Promising physicochemical technologies for poultry slaughterhouse wastewater treatment: A critical review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2021;9(2):105174.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105174>
6. Germany G. L, Rondón E. J, Durand N. N, De la Torre V. M, Mendoza Q. Y. Characterization of the biosecurity measures of poultry farms in the province of

Coronel Portillo, Ucayali-Peru. Peruvian Veterinary Investigations. 2019;30(3):1274-1282.

DOI: <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i3.16605>

7. Prazeres A, Fernandes F, Madeira L, Luz S, Albuquerque A, Simões R et al. Treatment of slaughterhouse wastewater by acid precipitation (H_2SO_4 , HCl and HNO_3) and oxidation ($Ca(ClO)_2$, H_2O_2 and CaO_2). Journal of Environmental Management. 2019; 250:109-558.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109558>

8. Hussain F, Shah S, Ahmad H, Abubshait S, Abubshait H, Laref A et al. Microalgae an ecofriendly and sustainable wastewater treatment option: Biomass application in biofuel and bio-fertilizer production. A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2021; 137.

DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110603>

9. Posadas E, Alcántara C, García-Encina P, Gouveia L, Guieysse B, Norvill Z et al. Microalgae cultivation in wastewater. Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts. 2017:67-91.

DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00003-0>

10. Saravanan A, Kumar P, Varjani S, Jeevanantham S, Yaashikaa P, Thamarai P et al. A review on algal-bacterial symbiotic system for effective treatment of wastewater. Chemosphere. 2021;271.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129540>

11. Salgueiro J, Pérez L, Maceiras R, Sánchez Á, Cancela Á. Semicontinuous Culture of *Chlorella vulgaris* Microalgae for Wastewater Treatment. International Journal of Environmental Research. 2018;12(6):765-772.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s41742-018-0129-4>

-
12. Hernandez, M. & Gonzalez, N.. Recursos Hídricos y Ambiente. Elementos de política ambiental. Cámara de Diputados de la provincia de Buenos Aires. Argentina. 1993
13. Moher D, Liberati A, Tetzlaff, J, Altman D. G. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. J. Clin. Epidemiol. 2009; 62: 1006–1012.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2009.06.005>.
14. Mittal, G. S. Treatment of Wastewater from Abattoirs before Land Application: A Review. Bioresour. Technol. 2006; 97: 1119–1135.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.11.021>.
15. Sayadi, M. H., & Nourzadeh, M. Potential of anaerobically digested poultry wastewater for metal biosorption by *Rhodobacter blasticus* and *Rhodobacter capsulatus*. Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences. 2018; 8(1): 47-55.
16. Liu W, Zeng D, She L, Su W, He D, Wu G et al. Comparisons of pollution characteristics, emission situations, and mass loads for heavy metals in the manures of different livestock and poultry in China. Science of The Total Environment. 2020; 734.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139023>.
17. Rajab A, Salim M, Sohaili J, Anuar A, Salmiati, Lakkaboyana S. Performance of integrated anaerobic/aerobic sequencing batch reactor treating poultry slaughterhouse wastewater. Chemical Engineering Journal. 2017; 313:967-974.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.10.144>

-
18. Burton, C. H., Cumby, T. R., Tinker, D. B. Treatment and disposal of poultry processing waste. Poultry meat processing and quality. 2004; 345-376.
19. Del Nery V, de Nardi I, Damianovic M, Pozzi E, Amorim A, Zaiat M. Long-term operating performance of a poultry slaughterhouse wastewater treatment plant. Resources, Conservation and Recycling. 2007;50(1):102-114.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2006.06.001>
20. Chávez P. C, Castillo L. R, Dendooven L, Escamilla-Silva E. Poultry slaughter wastewater treatment with an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. Bioresource Technology. 2005;96(15):1730-1736.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.08.017>
21. Basitere M, Njoya M, Rinqwest Z, Ntwampe S, Sheldon M. Performance evaluation and kinetic parameter analysis for static granular bed reactor (SGBR) for treating poultry slaughterhouse wastewater at mesophilic condition. Water Practice and Technology. 2019;14(2):259-268.
DOI: <https://doi.org/10.2166/wpt.2019.010>
22. Whitehead W. Activated Sludge Treatment of Poultry Processing Wastewater. Poultry Science. 1978;57(2):433-438.
DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.0570433>
23. Li J, Wei J, Ngo H, Guo W, Liu H, Du B et al. Characterization of soluble microbial products in a partial nitrification sequencing batch biofilm reactor treating high ammonia nitrogen wastewater. Bioresource Technology. 2018; 249:241-246.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.013>
24. He Y, Xu P, Li C, Zhang B. High-concentration food wastewater treatment by an anaerobic membrane bioreactor. Water Research. 2005;39(17):4110-4118.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.07.030>.

25. Rumana, R. Fundamentals of Wastewater Treatment And Engineering. CRC Press. 2013.

26. Masters, G.M., Ela, W.P., 2014. Introduction to Environmental Engineering and Science. PEARSON. 2014.

27. Bayar S, Yıldız Y, Yılmaz A, İrdemez Ş. The effect of stirring speed and current density on removal efficiency of poultry slaughterhouse wastewater by electrocoagulation method. Desalination. 2011;280(1-3):103-107.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.06.061>.

28. Jayathilakan K, Sultana K, Radhakrishna K, Bawa A. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. Journal of Food Science and Technology. 2011;49(3):278-293.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0290-7>.

29. Van Haandel A. Handbook of Biological Wastewater Treatment: Design and Optimisation of Activated Sludge Systems. Water Intelligence Online. 2012;11.

30. Pabon, S. L.; Gelvez, J. H. S. Starting-up and Operating a Full- Scale Activated Sludge System for Slaughterhouse Wastewater. Ing. Invest. 2009; 29: 53–58.

31. Fongsatitkul P, Wareham D, Elefsiniotis P. Treatment of four industrial wastewaters by sequencing batch reactors: evaluation of COD, TKN and TP removal. Environmental Technology. 2008;29(11):1257-1264.
DOI: : 10.1080/09593330802308978

32. Bustillo-Lecompte C, Mehrvar M, Quiñones-Bolaños E. Cost-effectiveness analysis of TOC removal from slaughterhouse wastewater using combined anaerobic-aerobic and UV/H₂O₂ processes. *Journal of Environmental Management*. 2014;134: 145-152.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.12.035>.
33. Aquino J, Pereira G, Rocha-Filho R, Bocchi N, Biaggio S. Combined Coagulation and Electrochemical Process to Treat and Detoxify a Real Textile Effluent. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2016;227(8).
DOI: <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2967-z>.
34. Kobya M, Senturk E, Bayramoglu M. Treatment of poultry slaughterhouse wastewaters by electrocoagulation. *Journal of Hazardous Materials*. 2006;133(1-3):172-176.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.10.007>.
35. Borowitzka M. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*. 1999;70(1-3):313-321.
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0079-6352\(99\)80123-4](https://doi.org/10.1016/s0079-6352(99)80123-4).
36. Almandoz M, Pagliero C, Ochoa N, Marchese J. Composite ceramic membranes from natural aluminosilicates for microfiltration applications. *Ceramics International*. 2015;41(4):5621-5633.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.12.144>.
37. Kurup G, Adhikari B, Zisu B. Treatment performance and recovery of organic components from high pH dairy wastewater using low-cost inorganic ferric chloride precipitant. *Journal of Water Process Engineering*. 2019;32:100908.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.100908>.

-
38. Prazeres A, Carvalho F, Rivas J. Cheese whey wastewater treatment by acidic precipitation. Proceedings of XIV world water congress, international water resources association and water and energy resources secretariat of Pernambuco State. Brazil.; 2011.
39. Rivas F, Beltrán F, Carvalho F, Acedo B, Gimeno O. Stabilized leachates: sequential coagulation–flocculation + chemical oxidation process. *Journal of Hazardous Materials*. 2004;116(1-2):95-102.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.07.022>.
40. Rivas J, Prazeres A, Carvalho F, Beltrán F. Treatment of Cheese Whey Wastewater: Combined Coagulation–Flocculation and Aerobic Biodegradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010;58(13):7871-7877.
41. Lo Y. Recovery of protein from poultry processing wastewater using membrane ultrafiltration. *Bioresource Technology*. 2005;96(6):687-698.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.026>
42. Ruiz I, Veiga M, de Santiago P, Blázquez R. Treatment of slaughterhouse wastewater in a UASB reactor and an anaerobic filter. *Bioresource Technology*. 1997;60(3):251-258.
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(97\)00020-5](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(97)00020-5)
43. Salazar M. Aplicación e Importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I)*. 2005; 59: 64-70.
44. Zeng, X., Guo, X., Su, G., Danquah, M.K., Zhang, S., Lu, Y., Sun, Y., Lin, L. Bioprocess considerations for microalgal-based wastewater treatment and biomass production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015; 42: 1385-1392

45. Dickinson, K.E., Bjornsson, W.J., Garrison, L.L., Whitney, C.G., Park, K.C., Banskota, A.H., McGinn, P.J. Simultaneous remediation of nutrients from liquid anaerobic digestate and municipal wastewater by the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD grown in continuous chemostats. *J. Appl. Microbiol.* 2015; 118: 75-83.
46. Zerrouki D, A H. Outdoor Microalgae Cultivation for Wastewater Treatment. In: Gupta S, Bux F, ed. by. *Application of Microalgae in Wastewater Treatment*. Springer Cham; 2019. p. 81-99.
47. Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R.W., Das, K.C. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology*. 2010; 101: 3097–3105.)
48. Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M., Das, K.C. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*. 2011; 88: 3425–3431
49. Priya, J.A., Rao, P.S., Vijaya, Y., Reddy, A.S., Krishnaiah, A. Biosorption of chromium(VI), nickel(II) and copper(II) ions from aqueous solutions using *Pithophora* algae. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 2007; 89, 421–442
50. Choi H. Biosorption of Heavy Metals from Acid Mine Drainage by Modified Sericite and Microalgae Hybrid System. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2015;226(6).
51. Ramanan R, Kim B, Cho D, Oh H, Kim H. Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *Biotechnology Advances*. 2016;34(1):14-29.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.003>

52. Farnelid H, Tarangkoon W, Hansen G, Hansen P, Riemann L. Putative N₂-fixing heterotrophic bacteria associated with dinoflagellate–Cyanobacteria consortia in the low-nitrogen Indian Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*. 2010;61(2):105-117.

DOI: <https://doi.org/10.3354/ame01440>

53. Marcihac C, Sialve B, Pourcher A, Ziebal C, Bernet N, Béline F. Control of nitrogen behaviour by phosphate concentration during microalgal-bacterial cultivation using digestate. *Bioresource Technology*. 2015;175:224-230.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.022>

54. Croft M, Lawrence A, Raux-Deery E, Warren M, Smith A. Algae acquire vitamin B₁₂ through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature*. 2005;438(7064):90-93.

DOI: <https://doi.org/10.1038/nature04056>

55. de-Bashan L, Trejo A, Huss V, Hernandez J, Bashan Y. *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. *Bioresource Technology*. 2008;99(11):4980-4989.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.065>

56. Kim B, Ramanan R, Cho D, Oh H, Kim H. Role of *Rhizobium*, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction. *Biomass and Bioenergy*. 2014; 69:95-105.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.07.015>

57 Higgins BT, Paddock MB, Staley S, Ceballos SJ, VanderGheynst JS. Modeling of photosynthetic aeration for energy-efficient wastewater treatment and reduce

greenhouse gas emissions. ASABE Annual International Meeting, American Society of Agricultural and Biological Engineers; 2017.

58. Holmes B, Paddock M, VanderGheynst J, Higgins B. Algal photosynthetic aeration increases the capacity of bacteria to degrade organics in wastewater. *Biotechnology and Bioengineering*. 2019;117(1):62-72.

DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.27172>

59. Paddock M, Fernández-Bayo J, VanderGheynst J. The effect of the microalgae-bacteria microbiome on wastewater treatment and biomass production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019;104(2):893-905.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10246-x>

60. Patil S, Kumar M, Ball A. Microbial community dynamics in anaerobic bioreactors and algal tanks treating piggery wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010;87(1):353-363.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2539-x>

61. Su Y, Mennerich A, Urban B. Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. *Water Research*. 2011;45(11):3351-3358.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.046>

62. Su Y, Mennerich A, Urban B. Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge for wastewater treatment: Influence of algae and sludge inoculation ratios. *Bioresource Technology*. 2012; 105:67-73.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.113>

63. Krustok I, Truu J, Odlare M, Truu M, Ligi T, Tiirik K et al. Effect of lake water on algal biomass and microbial community structure in municipal wastewater-

based lab-scale photobioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015;99(15):6537-6549.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6580-7>

64. Alcántara C, Domínguez J, García D, Blanco S, Pérez R, García-Encina P et al. Evaluation of wastewater treatment in a novel anoxic–aerobic algal–bacterial photobioreactor with biomass recycling through carbon and nitrogen mass balances. *Bioresource Technology*. 2015;191:173-186.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.125>

65. Ye J, Song Z, Wang L, Zhu J. Metagenomic analysis of microbiota structure evolution in phytoremediation of a swine lagoon wastewater. *Bioresource Technology*. 2016; 219:439-444.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.013>

66. Higgins B, Gennity I, Fitzgerald P, Ceballos S, Fiehn O, VanderGheynst J. Algal–bacterial synergy in treatment of winery wastewater. *npj Clean Water*. 2018;1(1).

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41545-018-0005-y>

67. Richmond A. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science; 2004.

68. Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2010;14(2):557-577.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>

69. Flotats, X., Foged, H. L., Blasi, A. B., Palatsi, J., Magri, A., & Schelde, K. M. Manure. Processing Activities in Europe. *Manure Processing Technologies*. 2011.

70. McGriff E, McKinney R. The removal of nutrients and organics by activated algae. *Water Research*. 1972;6(10):1155-1164.

DOI: [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(72\)90015-2](https://doi.org/10.1016/0043-1354(72)90015-2).

71. Park J, Craggs R, Shilton A. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*. 2011;102(1):35-42.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.158>

72. Abdel-Raouf N, Al-Homaidan A, Ibraheem I. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2012;19(3):257-275.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>

73. Park J, Craggs R, Shilton A. Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond. *Water Research*. 2011;45(20):6637-6649.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.042>

74. Rawat I, Ranjith Kumar R, Mutanda T, Bux F. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*. 2011;88(10):3411-3424.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025>

75. Harun R, Singh M, Forde G, Danquah M. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2010;14(3):1037-1047.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.11.004>

-
76. Flores, C. C., Peña-Castro, J. M., Flores-Cotera, L. B., & Cañizares-Villanueva, R. O. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*. 2003; 28(8), 450-456.
77. Oswald, W. J. Micro-algae and wastewater treatment. In: *Microalgal biotechnology*. Cambridge: M.A. Borowitzka, L.J. Borowitzka, 1988. p.305-328.
78. Ogbonna, J. C., Yoshizawa, H., Tanaka, H. Treatment of high strength organic wastewater by a mixed culture of photosynthetic microorganisms. *Journal of Applied Phycology*. 2000; 12(3): 277-284.
79. Borowitzka, M.A. Limits to growth, In: *Wastewater treatment with algae*. by Y.-S. Wong, N.F.Y. Tam, Springer Verlag. 1998. p.203–226.
80. Wood B, Grimson P, German J, Turner M. Photoheterotrophy in the production of phytoplankton organisms. *Journal of Biotechnology*. 1999;70(1-3):175-183.
DOI: [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(99\)00070-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(99)00070-x)
81. Lembi, C. A., Waaland, J. R. The role of microalgae in liquid waste treatment and reclamation. *Algae and Human Affairs*. Cambridge University Press. 1988; 251-281.
82. Fontes A, Angeles Vargas M, Moreno J, Guerrero M, Losada M. Factors affecting the production of biomass by a nitrogen-fixing blue-green alga in outdoor culture. *Biomass*. 1987;13(1):33-43.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0144-4565\(87\)90070-9](https://doi.org/10.1016/0144-4565(87)90070-9)
83. Benemann J. Production of nitrogen fertilizer with nitrogen-fixing blue - green algae. *Enzyme and Microbial Technology*. 1979;1(2):83-90.

DOI: [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(79\)90103-0](https://doi.org/10.1016/0141-0229(79)90103-0)

84. Oliver, R. L., Ganf, G. G. Freshwater blooms. In: 'The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space' by Whitton B.A. and Potts M. Kluwer: Dordrecht. 2000. p. 149–194.

85. Markou G, Georgakakis D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*. 2011;88(10):3389-3401.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.042>

86. Grobbelaar, J.U. Potential of algal production. *Water SA*. 1982; 8(2): 79–85.

87. Mostert E, Grobbelaar J. The influence of nitrogen and phosphorus on algal growth and quality in outdoor mass algal cultures. *Biomass*. 1987;13(4):219-233.

DOI: [https://doi.org/10.1016/0144-4565\(87\)90061-8](https://doi.org/10.1016/0144-4565(87)90061-8)

88. Borowitzka, M. A. Vitamins and fine chemicals from micro-algae. Cambridge University Press. 1988; 153–196.

89. Soeder, C. Productivity of microalgal systems in wastewater for aquaculture. University of the OFS Publication, Series C, N°3. 1981.

90. Chevalier P, Proulx D, Lessard P, Vincent, W F, De la Noüe, J. Nitrogen and phosphorus removal by high latitude mat-forming cyanobacteria for potential use in tertiary wastewater treatment. *Journal of Applied Phycology*. 2000; 12(2):105-112.

91. Bhaya, D., Schwarz, R., Grossman, A. R. Molecular responses to environmental stress. In: *The ecology of cyanobacteria*. Dordrecht: Springer. 2000. p 397-442.

-
92. Fogg, G. E., Thake, B. Algal cultures and phytoplankton ecology. Univ of Wisconsin Press. 1987.
93. de la Noüe J, Laliberté G, Proulx D. Algae and waste water. Journal of applied phycology. 1992; 4(3): 247-254.
94. Becker, E. W. Microalgae: biotechnology and microbiology. Cambridge: University Press; 1994.
95. Larsdotter, K. Wastewater treatment with microalgae-a literature review. Vatten. 2006; 62(1): 31.
96. Fulks, W., Main, K. L. The design and operation of commercial-scale live feeds production systems. Rotifer and Microalgae Culture Systems. The Oceanic Institute. 1991; 3-52.
97. Grobbelaar, J.U. Open semi-defined systems for outdoor mass culture of algae in Wastewater for aquaculture. University of the OFS. 1981; (3): 24-30
98. Hammouda O, Gaber A, Abdel-raouf N. Microalgae and Wastewater Treatment. Ecotoxicology and Environmental Safety. 1995;31(3):205-210.
DOI: <https://doi.org/10.1006/eesa.1995.1064>
99. Randrianarison G, Ashraf M. Microalgae: a potential plant for energy production. Geology, Ecology, and Landscapes. 2017;1(2):104-120.
DOI: <https://doi.org/10.1080/24749508.2017.1332853>
100. Bührer H. Light within algal cultures; Implications from light intensities within a lens. Aquatic Sciences. 2000;62(1):91.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s000270050078>

-
101. Richmond, A. Large scale microalgal culture and applications. Progress in phycological research.1990; 7: 1-62.
102. Robinson P. Immobilized Algal technology for Wastewater Treatment Purposes. Wastewater treatment with algae. Berlin: Springer; 1997.
103. Gupta P, Lee S, Choi H. A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2015;31(9):1409-1417.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1892-4>
104. Doran P. Bioprocess engineering principles. Amsterdam: Elvissier/Academic Press; 2013.
105. Barbosa M, Janssen M, Ham N, Tramper J, Wijffels R. Microalgae cultivation in air-lift reactors: Modeling biomass yield and growth rate as a function of mixing frequency. Biotechnology and Bioengineering. 2003;82(2):170-179.
DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.10563>
106. Demirbas, A. Biomass resource facilities and biomass conversion processing for fuels and chemicals. Energy Conversion and Management. 2001; 42: 1357–1378
107. Chisti, Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances. 2007; 25: 294–306
108. Lam M, Lee K. Catalytic transesterification of high viscosity crude microalgae lipid to biodiesel: Effect of co-solvent. Fuel Processing Technology. 2013;110:242-248.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2012.12.021>

109. Rawat I, Ranjith Kumar R, Mutanda T, Bux F. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*. 2013;103:444-467.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.10.004>

110. Shahid A, Malik S, Zhu H, Xu J, Nawaz M, Nawaz S et al. Cultivating microalgae in wastewater for biomass production, pollutant removal, and atmospheric carbon mitigation; a review. *Science of The Total Environment*. 2020;704:135-303

111. Vanthoor-Koopmans M, Wijffels R, Barbosa M, Eppink M. Biorefinery of microalgae for food and fuel. *Bioresource Technology*. 2013;135:142-149.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.135>

112. Harun R, Danquah M, Forde G. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2009.

DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.2287>

113. Domozych D, Ciancia M, Fangel J, Mikkelsen M, Ulvskov P, Willats W. The Cell Walls of Green Algae: A Journey through Evolution and Diversity. *Frontiers in Plant Science*. 2012;3.

DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00082>

114. Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Fonseca C, Spencer-Martins I, Gorwa-Grauslund M. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007;74(5):937-953.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0827-2>

115. John R, Anisha G, Nampoothiri K, Pandey A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*. 2011;102(1):186-193.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.139>

116. Ho S, Huang S, Chen C, Hasunuma T, Kondo A, Chang J. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. *Bioresource Technology*. 2013;135:191-198.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.015>

117. Romero García J, Acien Fernández F, Fernández Sevilla J. Development of a process for the production of l-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*. 2012; 112:164-170.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.094>

118. Dineshkumar R, Subramanian J, Gopalsamy J, Jayasingam P, Arumugam A, Kannadasan S et al. The Impact of Using Microalgae as Biofertilizer in Maize (*Zea mays* L.). *Waste and Biomass Valorization*. 2017;10(5):1101-1110.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0123-7>

119. Beijerinck, M. W. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. *Bot. Ztg*. 1890; 48, 781-788.

120. Yamamoto M, Fujishita M, Hirata A, Kawano S. Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Journal of Plant Research*. 2004;117(4).

121. Safi C, Zebib B, Merah O, Pontalier P, Vaca-Garcia C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014;35:265-278.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>

122. Ru I, Sung Y, Jusoh M, Wahid M, Nagappan T. *Chlorella vulgaris*: a perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts. *Applied Phycology*. 2020;1(1):2-11.

DOI: <https://doi.org/10.1080/26388081.2020.1715256>

123. Ursu A, Marcati A, Sayd T, Sante-Lhoutellier V, Djelveh G, Michaud P. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*. 2014; 157:134-139.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.071>

124. Montero-Sánchez Y, Gallo A, Gómez L, Álvarez I, Sabina L, Támbara Y, Ramírez L. Productividad de lípidos y composición de ácidos grasos de cinco especies de microalgas. *Investigación y Saberes*. 2012; 1(2): 37-43.

125. Ho S, Chen C, Lee D, Chang J. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems - A review. *Biotechnology Advances*. 2011;29(2):189-198.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.11.001>

126. Ohse S, Derner R, Ozório R, Braga M, Cunha P, Lamarca C et al. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. *Biotemas*. 2008;21(2).

DOI: <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2008v21n2p7>

127. Marín L. J, Colina A. G. Manual de prácticas de análisis de aguas y de residuos líquidos. Zulia; 2013.

128. Andersen R, Berges J, Harrison P, Watanabe M. Recipes for Freshwater and Seawater Media. *Algal Culturing Techniques*. 2005 :429-538.

DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-012088426-1/50027-5>

129. Eaton A, Franson M. Standard methods for the examination of water & wastewater. Washington, DC: American Public Health Association; 2005.

130. ASTM D3921. Standard Test Method for Oil and Grease and Petroleum Hydrocarbons in Water. 2011.

131. AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 1984.

132. NTP 209.263. Determination of fat Gravimetric Method. 2001. In: INDECOPI. Peruvian Technical Standard. Lima Peru. https://servicios.inacal.gob.pe/programa_actualizacion/ProgramaActualizacion.aspx?anio=2018.

133. NTP 209.265. Ash determination Gravimetric Method. 2001. In: INDECOPI. Peruvian Technical Standard. Lima Peru. https://servicios.inacal.gob.pe/programa_actualizacion/ProgramaActualizacion.aspx?anio=2018.

134. Eslahi N, Hemmatinejad N, Dadashian F. From Feather Waste to Valuable Nanoparticles. Particulate Science and Technology. 2014;32(3):242-250.

DOI: <https://doi.org/10.1080/02726351.2013.851135>

135. Han, L. Spectrometry of turbidity in surface water. En: International Geoscience and Remote Sensing Symposium. Lincoln, NE, USA: IGARSS '96;1996.

136. Mucha Z, Kułakowski P. Turbidity measurements as a tool of monitoring and control of the SBR effluent at the small wastewater treatment plant – preliminary study. *Archives of Environmental Protection*. 2016;42(3):33-36.

DOI: <https://doi.org/10.1515/aep-2016-0030>

137. Suffian Yusoff M, Mohd Azwan A, Ahmad Zamri M, Abdul Aziz H. Removal of colour, turbidity, oil and grease for slaughterhouse wastewater using electrocoagulation method. *AIP Conference Proceedings* [Internet]. AIP: LLC; 2017 [cited 15 September 2020].

Available from: <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.5005692>

138. Bayar S, Yildiz Y, Yilmaz A, Koparal A. The effect of initial pH on treatment of poultry slaughterhouse wastewater by electrocoagulation method. *Desalination and Water Treatment*. 2013;52(16-18):3047-3053.

DOI: <https://doi.org/10.1080/19443994.2013.800268>

139. Garg, R. K., Rao, R. J., Uchchariya, D., Shukla, G., & Saksena, D. N. Seasonal variations in water quality and major threats to Ramsagar reservoir, India. *African Journal of Environmental Science and Technology*. 2010; 4(2).

140. Rattanapan C, Sawain A, Suksaroj T, Suksaroj C. Enhanced efficiency of dissolved air flotation for biodiesel wastewater treatment by acidification and coagulation processes. *Desalination*. 2011;280(1-3):370-377.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.07.018>

141. Barros I, Amaral I, Lorenzon C, Junior J, Neto J. Potential microbiological contamination of effluents in poultry and swine abattoirs. *Epidemiology and Infection*. 2006;135(3):505-518.

DOI: <https://doi.org/10.1017/s0950268806006972>

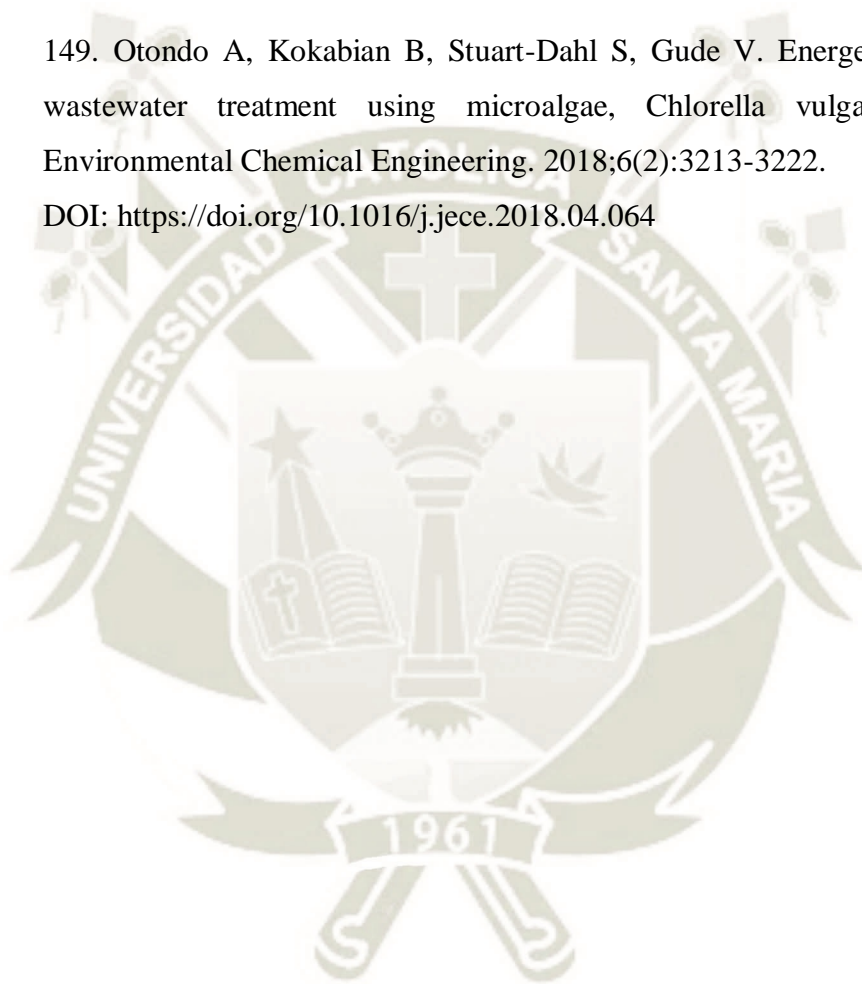
142. Álvarez-Ordóñez A, Fernández A, Bernardo A, López M. Acid tolerance in *Salmonella typhimurium* induced by culturing in the presence of organic acids at different growth temperatures. *Food Microbiology*. 2010;27(1):44-49.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.015>
143. Song C, Qiu Y, Xie M, Qi Y, Li S, Kitamura Y. Novel Bio-regeneration Concept via Using Rich Solution as Nutrition Resource for Microalgae Cultivation: Effect of pH and Feeding Modes. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2019;7(17):14471-14478.
DOI: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b01839>
144. Azam, R., Kothari, R., Singh, H., Ahmad, S., Ashokkumar, V. and Tyagi, V. Production of algal biomass for its biochemical profile using slaughterhouse wastewater for treatment under axenic conditions. *Bioresource Technology*. 2020; 306: 123-116.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123116>
145. Lee S, Lee N, Oh H, Ahn C. Enhanced and Balanced Microalgal Wastewater Treatment (COD, N, and P) by Interval Inoculation of Activated Sludge. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019;29(9):1434-1443.
DOI: <https://doi.org/10.4014/jmb.1905.05034>
146. Struk-Sokołowska J, Tkaczuk J. Analysis of Bakery Sewage Treatment Process Options Based on COD Fraction Changes. *Journal of Ecological Engineering*. 2018;19(4):226-235.
DOI: <https://doi.org/10.12911/22998993/89653>
147. Tagliaferro G, Izário Filho H, Chandel A, da Silva S, Silva M, Santos J. Continuous cultivation of *Chlorella minutissima* 26a in a tube-cylinder internal-loop airlift photobioreactor to support 3G biorefineries. *Renewable Energy*. 2019;130:439-445.

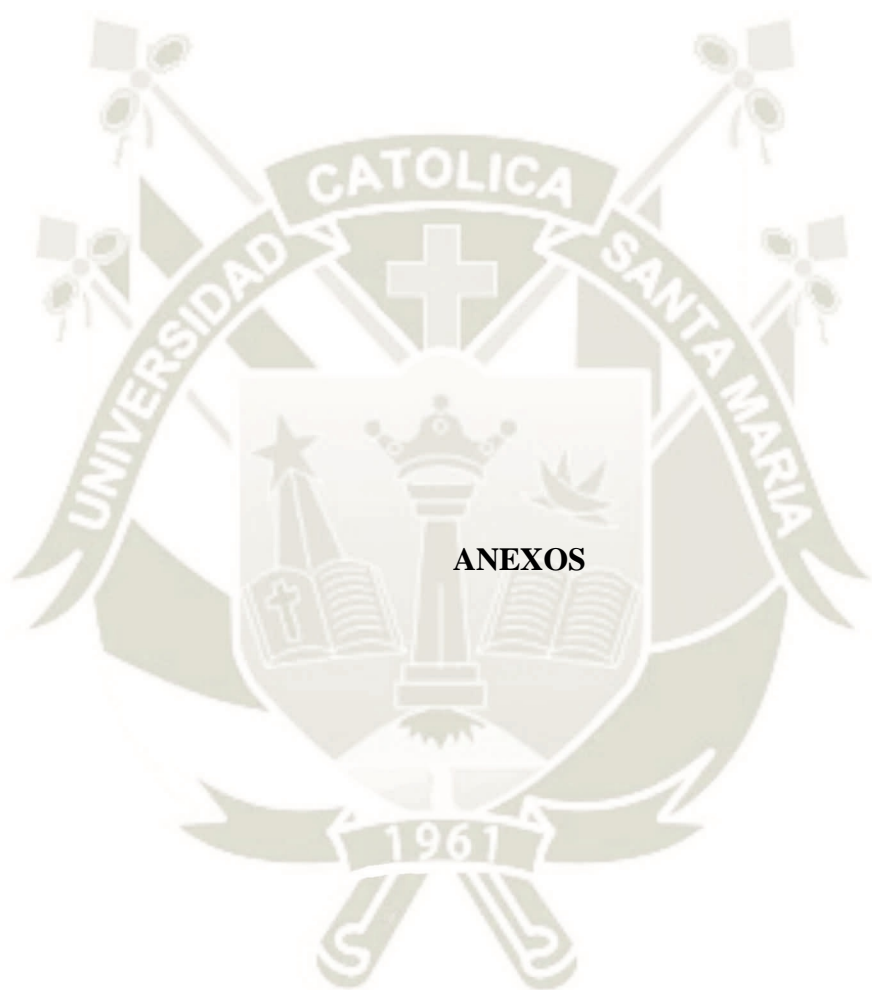
DOI: [https:// doi.org/10.1016/j.renene.2018.06.041](https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.06.041)

148. Tucker C, D'Abramo L. Managing high pH in freshwater ponds. Stoneville, Miss.: Southern Regional Aquaculture Center; 2008.

149. Otondo A, Kokabian B, Stuart-Dahl S, Gude V. Energetic evaluation of wastewater treatment using microalgae, *Chlorella vulgaris*. Journal of Environmental Chemical Engineering. 2018;6(2):3213-3222.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.04.064>






ANEXOS

ANEXO 1: Artículo científico “*Acid precipitation followed by microalgae (Chlorella vulgaris) cultivation as a new approach for treatment of poultry slaughterhouse wastewater*” publicado en la revista “*Bioresource Technology*”.


Bioresource Technology 335 (2021) 125284



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech



Acid precipitation followed by microalgae (*Chlorella vulgaris*) cultivation as a new approach for poultry slaughterhouse wastewater treatment

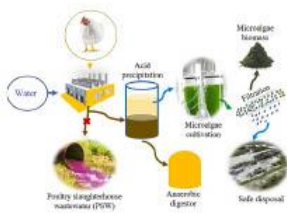
Ruly Terán Hilares^{*}, Kiara A. García Bustos, Fabio P. Sanchez Vera, Gilberto J. Colina Andrade, David A. Pacheco Tanaka

Laboratorio de Materiales, Universidad Católica de Santa María – UCSM, Urb. San José, San José S/n, Yanahuara, Arequipa, Peru

HIGHLIGHTS

- About 80% of COD_T was removed from PSW by acid precipitation at pH 4.
- PSW treated by acid precipitation was used as medium for microalgae cultivation.
- Microalgae cultivation in a continuous mode remove 63% of residual COD from PSW.
- The water obtained after membrane filtration allows safe disposal.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:
Poultry slaughterhouse wastewater (PSW)
Acid precipitation
Microalgae cultivation
Continuous process
Wastewater treatment

ABSTRACT

Poultry slaughterhouse wastewater (PSW) contains high organic matter and nutrients requiring thus a special treatment before its final disposal. In this work, acid precipitation (H₂SO₄) followed by microalgae “*Chlorella vulgaris*” cultivation both in batch and continuous processes was studied as an alternative method for PSW treatment. By reducing the pH value of PSW from 6 to 7 to 4, about 80% of the total chemical oxygen demand (COD_T) was removed as sludge. In the supernatant, the COD residual was efficiently removed (63%) by microalgae in the batch process, using an internal-loop concentric tube photobioreactor (4.5 L). Moreover, in continuous process, after 89 h, the COD value resulted lower than 200 mg L⁻¹ and 1.2 g L⁻¹ of microalgae in the output line. The proposed PSW treatment method is promising from economic and environmental viewpoints, since the microalgal biomass can be valued in a biorefinery context.

1. Introduction

The poultry industry has grown rapidly in 2019 as the poultry meat production in the world has reached nearly 128 million metric tons with 3% increase with respect to 2018 annual production (FAO, 2020). In the

case of Peru, poultry meat production (chicken, hen, turkey, duck, rooster) has reached 2.15 million metric tons (2019), a 4.8% increase with respect to 2018 (Gutiérrez, 2019). The freshwater in poultry industry is used for chilling, bird washing, cleaning, and waste conveying, resulting in an average of 20 L water per bird in a typical processing

^{*} Corresponding author.
E-mail address: rteran@ucsm.edu.pe (R. Terán Hilares).

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125284>

Received 7 March 2021; Received in revised form 6 May 2021; Accepted 9 May 2021
Available online 13 May 2021
0960-8524/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

facility (Avula et al., 2009). The large amount of poultry slaughterhouse wastewater (PSW) generated is considered as one of the most polluting effluents due to its high load of organic matter, suspended solids, complex mixture of fat, protein, and nutrients, requiring special care before its disposal into the environment (Terán Hílares et al., 2021).

Several methods, such as coagulation (Dassey and Theegala, 2012), electrocoagulation (Potrich et al., 2020), advanced oxidative process-AOP (Davarnejad and Nasiri, 2017), dissolved air flotation-DAF (Del Nery et al., 2007), anaerobic-aerobic digestion (Adou et al., 2020) have been used for the treatment of several slaughterhouse wastewaters. From these, coagulation process using inorganic coagulants is envisaged to be an effective treatment; however, for large scale applications, it is scarcely studied, considering the large dosage requirements. Also, toxic sludge production, is ineffective to remove emergent pollutants; besides, the high load of inorganic coagulant like aluminum could increase the metal concentration in the water which can be harmful to human health (Zhang et al., 2006; Teh et al., 2016; Krupínska, 2020). In addition to this, the physical (color) and chemical characteristics of water can change, making things worst in the disposal of sludge (Kumar et al., 2017).

As an alternative, a novel acid precipitation PSW method (using H_2SO_4) from various animal species was reported recently (Prateres et al., 2019). In the process, the pH of the effluent is decreased, producing precipitates which trap and drag the suspended and colloidal matter, allowing thus the reduction of organic matter, turbidity and nutrients (Garg et al., 2010; Rattanapan et al., 2011; Terán Hílares et al., 2021). Although, this technique is promising to remove high percentage of organic compounds, it is not enough to reach the maximum permissible limits required to discharge according to Peruvian environmental legislation "DS N°015-2015-MINAM", e.g., COD value < 200 mg/L. In this way, the subsequent biological treatment using microalgal species can be a promising alternative, as the produced microalgae biomass can be used for the production of several products such as fertilizer or biofuels.

Microalgae has been used extensively for wastewater bioremediation (Azam et al., 2020; Hernández et al., 2016; Nagarajan et al., 2019); however, specifically for poultry processing wastewater, it has not been reported yet. Cultivation of microalgae in wastewater is considered an eco-friendly and more suitable method than bacteria-based treatment from an economic and environmental viewpoint as the process also reduces the pollutants and pathogens (Agüera et al., 2020; Hussain et al., 2021; Posadas et al., 2017). Microalgae has a high rate of photosynthetic activities which, when combined with bioproduct generation, has the capacity of being an economical pathway to get sustainable energy generation in the future. Indeed, several algae strains have been used for wastewater treatment, but *C. vulgaris* could be one of the best microalgae for wastewater treatment, due to its high capability of nutrients (N and P) and COD removal (Saravanan et al., 2021), ability and capacity to adapt to several wastewater types and compositions (Salgueiro et al., 2016).

In this work, the PSW was submitted to acid precipitation and the filtrate was used for microalgae "*Chlorella vulgaris*" cultivation in batch and continuous processes in an internal-loop concentric tube photobioreactor (4.5 L). The efficiency of the process was evaluated based on chemical oxygen demand (COD) removal and microalgal productivity. On the other hand, some parameters of wastewater before and after treatment were also reported, aiming to compare the efficiency of the proposed method.

2. Material and methods

2.1. Microalgae

Microalgae "*Chlorella vulgaris*" was obtained from an algae culture collection at the biotechnology laboratory of Catholic University of Santa María (Arequipa, Peru). The microalgae was cultivated in 250 mL

of Bold's Basal Medium (BBM). The culture was placed at 25 °C under a light with continuous illumination ($440 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ of photon flux density).

2.2. Wastewater source and collection

Poultry slaughterhouse wastewater (PSW) was obtained from a local poultry processing industry (Arequipa, Peru). The PSW was filtered in order to remove coarse particles, and the filtered wastewater was characterized through total chemical oxygen demand (COD_T), biochemical oxygen demand (BOD_5), total suspended solids (TSS) and turbidity, using a standard methods for wastewater characterization APHA (2005). Oil and fat were determined according to the method ASTM D3921 (2011). The nitrogen (total) and phosphorus (total) were measured by using a commercial Spectroquant® cell test (Merck, Germany).

2.3. Wastewater acid precipitation

These experiments were performed using 800 mL of PSW (pH 6–7) effluent in graduated cylinders (1000 mL). The samples were acidified by adding 0.25 M sulfuric acid until pH 2, 3, 4, 5 and 6, respectively, and then kept static for 15–30 min for particle sedimentation. The supernatants were recovered using a peristaltic pump and analyzed in parameters as chemical oxygen demand (COD), BOD_5 , turbidity, oil and fat, according to methods indicated in section 2.2. The sedimented fractions were centrifuged and dried in an oven at 60 °C and then analyzed in their proximal composition by proper methods such as: Kjeldahl for proteins (AOAC, 1984), gravimetry after Soxhlet extraction (NTP 209.263, 2001) and ash by gravimetric method (NTP 209.265, 2001), as well as carbohydrates through their differentiation with respect to other components. Results were expressed in percentages on dry basis.

In the supernatant, the microbiological analysis was performed. Firstly, the supernatant obtained in each condition was diluted 100 times and then cultivated in plates containing potato dextrose agar (PDA) and incubated at 35 °C for 24 h. The supernatants obtained after sedimentation (pH 4) were recovered and used for microalgae cultivation.

2.4. Microalgae cultivation at different pH and dilution of TPSW

Microalgae were cultivated in an Erlenmeyer flask using 250 mL of treated poultry slaughterhouse wastewater (TPSW) obtained at pH 4. In the first case, the effect of the pH (pH 4, 5 and 6) was studied. The pH was adjusted by adding NaOH 0.1 M, and 10 mL microalgae were inoculated in each one. In the second case, the effect of TPSW dilution (25%, 50%, 75% and 100%) at pH 6 was studied, adding appropriate amounts of distilled water, and 10 mL of microalgae were inoculated, achieving $150\text{--}300 \text{ mg L}^{-1}$ of microalgae in the reactor in each one. The experiments were carried out up to maximum 68 h. In both cases, experiments were carried out at 25 °C under continuous illumination of white LED light ($440 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ of photon flux density). Samples were obtained periodically in order to analyze the biomass concentration, chemical oxygen demand (COD) and pH.

2.5. Microalgae cultivation in a TPSW - batch process

The TPSW was used as a medium for microalgae cultivation in an internal-loop concentric tube photobioreactor (350 mm × 150 mm, 5L) (Fig. 1), containing 4.5 L of TPSW at an initial pH of 6 and microalgae concentration in the reactor of 250 mg L^{-1} . The experiment was carried out during 72 h at 25–27 °C with continuous illumination ($440 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ of photon flux density) and constant air supply into the reactor (0.2 vvm) for constant homogenization. During the process, samples were obtained periodically to analyze the microalgae concentration, chemical

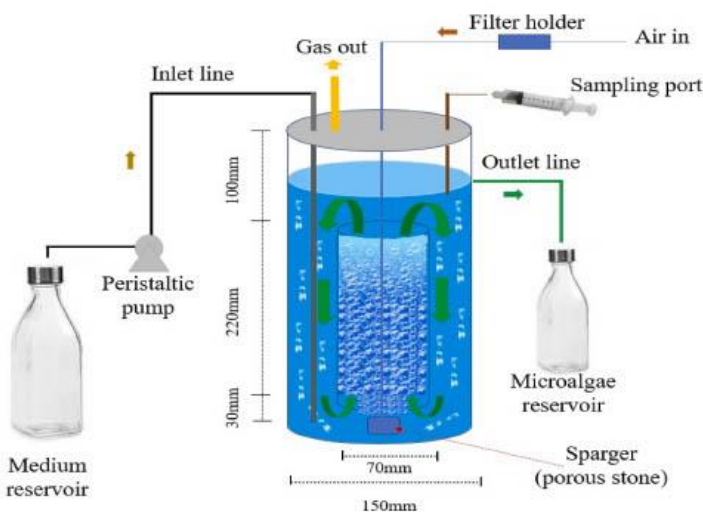


Fig. 1. Schematic diagram of continuous cultivation system used for *Chlorella vulgaris* microalgae cultivation in PSW.

oxygen demand (COD) and pH.

2.6. Microalgae cultivation in a TPSW - continuous process

The PSW was also used for microalgae cultivation in a continuous mode. The process was initiated in a batch process as described in section 2.5 for 48 h. Then, the continuous process was initiated using a peristaltic pump to feed the TPSW (pH of 6) continuously into the reactor at $0.85 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ (HRT = 3.4 days). The continuous process was performed during 207 h at 25°C under continuous illumination ($440 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ of photon flux density) and constant air supply (0.2 vvm). To keep the volume constant, excess was removed constantly from the reactor by the output line, from where samples were collected periodically to analyze the microalgae biomass, chemical oxygen demand (COD) and pH.

Additionally, a preliminary experiment using microfiltration (ceramic membrane, $3 \mu\text{m}$ of pore size from Inopor) was incorporated in the microalgae reservoir for microalgae separation, and the obtained water was analyzed in COD, BOD_5 and turbidity.

3. Result and discussion

3.1. Physicochemical properties of PSW

The PSW contains high values of organic compounds expressed as total COD_T (2185–7313 mg L^{-1}), nutrients as total N (110–175 mg L^{-1}) and P (44–67 mg L^{-1}), and lipids (281–830 mg L^{-1}); neutral pH (6.84–7.28) and high biodegradability index (BOD_5/COD , 0.76). The results obtained are in the range of similar samples reported in the literature (Chávez et al., 2005; Del Nery et al., 2007; Paulista et al., 2018). The turbidity of PSW was around 650–950 NTU, in the range of 719 NTU reported by Basitere et al. (2019). This parameter represents an enormous problem for the treatment process due to the presence of very small colloidal particles and large flocs including clay, silt, finely divided organic and inorganic matter, soluble colored organic compounds (e.g., blood) and microorganisms (Yusoff et al., 2017).

Considering the large volume of effluent generated in poultry

slaughterhouse industry and the characteristics of PSW, the development of suitable technology for this treatment is crucial. In this way, PSW is pre-treated by submitting to acid precipitation; this is briefly discussed in the following section.

3.2. Acid precipitation of PSW

The effect of pH (2–7) on physicochemical properties of PSW was evaluated and the results are shown in Fig. 2. As observed in Fig. 2A, the highest COD_T removal (81%) was obtained in the supernatant at pH 4. Besides the COD reduction by effect of acid precipitation, the color and turbidity of wastewater were reduced significantly, making the treatment process easier. Turbidity is caused by the presence of particle suspended or dissolved. This parameter was considerably reduced from 650 to 950 NTU to 98 NTU, at pH 4. Moreover, the average particle size in the supernatant (pH = 4) was 726 nm, which is lower than the untreated PSW (1432 nm). The sedimentation at pH < 6, can be associated to the isoelectric point (IP) of dissolved or suspended protein in the PSW which is around 4.6 (Lo et al., 2005), since the protein content represent 35–70% of the total COD in PSW (Lo et al., 2005; Ruiz et al., 1997). Thus, 73% of COD was removed from poultry slaughterhouse wastewater by the electrocoagulation method ($\text{CD} = 1 \text{ mA cm}^{-2}$, 150 rpm, 20 min and 293 K) at pH 4 (Bayar et al., 2011). In the same way, acid precipitation was better at pH 3, 4 and 5 for another type of wastewater (Garg et al., 2010; Rattanapan et al., 2011). However, the obtained result is contrary to the one previously reported by Prazeres et al. (2019) for acid precipitation of slaughterhouse wastewater where the organic matter elimination, measured as COD, increases as a function of pH, reaching the maximum at pH of 6 (97%) and the minimum at pH 1 (45%).

PSW is highly laden with organic matters as almost 35% of it corresponds to the large floating debris resulting from the agglomeration of grease and fat. In the meantime, the major fraction (around 55%) corresponds to suspended solids containing lipids, proteins, pathogenic microbes, and others (Goswami and Pugazhenth, 2020; Lo et al., 2005). Therefore, it is expected to obtain high content of fat and protein in the sedimented fraction. In Fig. 2B, the proximal composition, with lipid

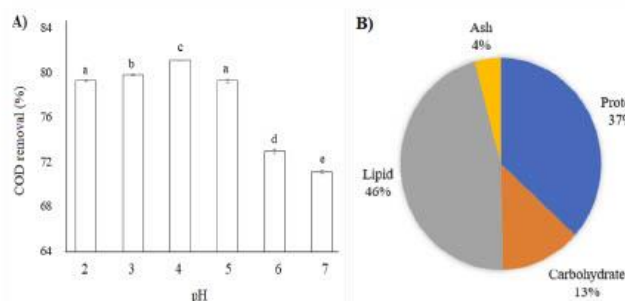


Fig. 2. COD₇ removal at different pH condition (A) and proximal composition of dried sedimented fraction (B). In Figure (A): Results are mean of three replicates. Different small letters above the column are indicative of significant differences ($p < .05$) assessed through a multiple range Duncan test.

(46%) and protein (37%) as the main components of the sludge obtained from acid precipitation can be observed. These can be used in anaerobic processes to produce biogas as a valuable residue.

The PSW is a dangerous effluent since it may contain pathogenic microbes such as coliforms (e.g., *E. coli*), *salmonella*, and others (Barros et al., 2007). A significant reduction in the microbial load after sedimentation at pH 4 was observed and it was lower than the one observed for pH 5, 6 and 7. This reduction can be due to the microorganism sedimentation together with organic matter and it is affected by pH. It is known that pH around 6.5–7.5 is considered optimal for *Salmonella* and *E. coli*; however, a low pH affects the survival of bacteria (Álvarez-Ordóñez et al., 2010; Keerthirathne et al., 2016).

At pH 4, the supernatant obtained showed low turbidity and color and it can be used as suitable substrate for microalgae cultivation. In the subsequent step, the supernatant obtained after acid precipitation of PSW, renamed as treated PSW (TPSW), was set at pH 5 and 6, and then inoculated with microalgae (Table 1). The supernatant at initial pH 6 results in the best culture medium for microalgae cultivation, achieving the highest biomass production (415 mg L^{-1}) and COD removal (82%). The high COD removal can be associated to the microalgae growth, achieving 75% higher in microalgae concentration than the one observed for pH 5. On the other hand, the pH of the medium increased quickly, achieving around 8.5 in a 48 h process. An increase in the pH of the culture medium for *Chlorella* was also reported by Song et al. (2019); in that work, other type of medium was used, but the pH of modified BG11 medium increased from 7 to 9.5 in 3 days.

Table 1
Microalgae cultivation in medium containing poultry slaughterhouse wastewater (PSW) at 75% (w/w) and different initial pH. The pH of medium was not controlled during the process.

Initial values			Values after 48 h			DQO removal
pH	DQO (mg L^{-1})	Biomass (mg L^{-1})	pH	DQO (mg L^{-1})	Biomass (mg L^{-1})	
4.00 ± 0.1	1133 ± 101	159	4.21 ± 0.18a	844 ± 17a	197 ± 22a	26%
5.02 ± 0.2	1133 ± 101	159	7.48 ± 0.80b	652 ± 71b	237 ± 59b	43%
6.01 ± 0.1	1133 ± 101	159	8.55 ± 0.18c	207 ± 29c	415 ± 30c	82%

The reported value corresponds to average of triplicates experiments ± standard deviation (SD). Means within a column with the same letter are not significantly different ($p > .05$) as revealed by a Duncan test.

3.3. Microalgae cultivation at different TPSW dilution

TPSW was set at pH 6 and used as a medium for microalgae cultivation at different dilutions, aiming to evaluate the toxicity of wastewater (Table 2). For undiluted medium (COD value = 1215 mg L^{-1}), 81% of COD was removed in 68 h. That value was lower compared to the one obtained in diluted medium (98–100% of COD removal). This result shows that for this sample, it is not necessary to dilute the supernatant fraction of PSW for microalgae cultivation. Although, reports using "*Chlorella vulgaris*" for TPSW are not available. This result is closer to the one obtained for *Chlorella pyrenoidosa* cultivated in slaughterhouse wastewater (from cattle/goat/sheep/buffalo/pig) (Azam et al., 2020). In that work, the best medium for microalgae cultivation corresponds to 50% diluted (1714 mg L^{-1} of COD). Then, once determined the viability of microalgae "*Chlorella vulgaris*" to grow in undiluted TPSW, experiments in bioreactor were performed and the results are shown in the following section.

3.4. TPSW for microalgae cultivation in batch followed by a continuous process

The TPSW set at pH 6 was used for microalgae "*C. vulgaris*" cultivation in batch and continuous process using an internal-loop concentric tube photo bioreactor (ICTB) (Fig. 1) and results are shown in Fig. 3. As observed, the chemical oxygen demand (COD) value decreased 83% after a 48 h process. In addition to this, 58% and 60% of nutrients as total nitrogen and phosphorus respectively, were also removed. The considerable reduction can be attributed to the consumption of a large portion of nutrients by symbiotic co-cultivation "*Chlorella vulgaris*" microalgae and wild bacteria (*Salmonella*, *E. coli*, *Clostridium* and *Staphylococcus* and others) present in PSW as previously reported for other wastewaters (Avula et al., 2009; Ferro et al., 2019), mainly in the first 48 h of the process when the pH of the medium is between 6 and 8.5, optimal pH for bacteria growth. After 48 h of the process, the pH of the medium was higher than 9 and the COD was maintained at around 200 mg L^{-1} . The variation of the pH above 9 affects the bacterial growth, attributing the removal of nutrients mainly to microalgae, and the residual COD values can be attributed to the presence of non-soluble slowly biodegradable and non-biodegradable compounds of PSW (Struk-Sokolowska and Tkaczuk, 2018). The remaining COD in the wastewater can be removed if the process time is extended, as reported for *Phormidium* sp. For cattle-slaughterhouse wastewater treatment (Maroneze et al., 2014), where 90% of COD and 57% and 52% of total nitrogen and phosphorus respectively, were removed.

After 48 h of batch process, a continuous process was initiated, and the results are shown in Fig. 3. The COD and microalgae biomass during

Table 2

Microalgae cultivation in diluted medium based in treated poultry slaughterhouse wastewater (TPSW).

Dilution	PPW(mL)	Distilled water(mL)	Microalgae concentration(mg L ⁻¹) *	COD concentration(mg L ⁻¹)			COD removal *
				0 h	48 h	68 h	
F-25%	50	150	919 ± 0.2a	306 ± 40a	16 ± 2a	-	100%
F-50%	100	100	968 ± 0.2b	645 ± 42b	133 ± 35b	11 ± 8a	98%
F-75%	150	50	1129 ± 0.1c	838 ± 21c	288 ± 24c	90 ± 24b	88%
F-100%	200	0	1215 ± 0.1d	1328 ± 7d	469 ± 30d	258 ± 24c	81%

*values correspond to calculated for 68 h. The initial microalgae concentration in all experiment were 282 mg L⁻¹. The reported value corresponds to average of triplicates experiments ± standard deviation (SD). Means within a column with the same letter are not significantly different (p > .05) as revealed by a Duncan test.

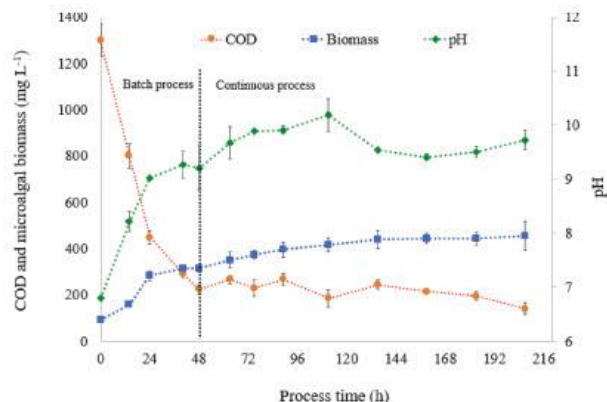


Fig. 3. Profile of COD, pH and biomass during the treatment of TPSW in a batch and continuous treatment using a concentric tubular airlift type photobioreactor.

the continuous process was around 200 mg L⁻¹ and 1.2 g L⁻¹, respectively. The fed TPSW (pH 6) at 0.85 mL min⁻¹ (HRT of 3.4 days) containing around 1300 mg L⁻¹ COD was successfully reduced at around 200 mg L⁻¹ in a continuous process. During the process, the green color characteristic of the medium was progressively intensified due to "chlorophyll-a" present in the microalgae as previously reported by Tagliaferro et al. (2019).

Changes in the pH of the medium were also observed during the batch process. The pH of the medium increased from 6 to 8.5 in 48 h, then in the continuous process, the pH showed slight variation around 9–9.5. The pH of the medium increases due to the hydroxide generated by the reduction of oxygen molecules produced during the photosynthesis (Tucker and Abramo, 2008) and by the consumption of CO₂ and HCO₃⁻ production (Park et al., 2011). A quick increase of pH during microalgae cultivation in batch process, using municipal wastewater as substrate (COD of 125 mg L⁻¹) was also reported by Otondo et al. (2018); the pH of the medium increased from 7 to 10 in 4 days, then the pH was maintained at around 10.

Finally, as a preliminary study, in the outlet stream, a single channel tubular membrane (Al₂O₃) (7 mm × 250 mm from Inopor, Germany) with 3 μm pore size was incorporated for microalgae recovery and the results are shown in Table 3. As observed, the filtered water COD value was averaged in 97 mg L⁻¹ which is slightly lower than the one achieved in the medium before filtration (around 200 mg L⁻¹). Therefore, the membrane retains mainly the microalgae. In spite of this, the properties measured for the filtered water using 3 μm are slightly higher than the ones established by the Peruvian government legislation "DS N°015-2015-MINAM" for water category 3 which is used for water used in irrigation of tall and low stem crops, where the maximal COD and BOD₅ values are 40 and 15 g L⁻¹, respectively. Therefore, the established values in legislation can be achieved in a subsequent nanofiltration (800 nm

Table 3

Parameters of TPSW obtained after acid precipitation and after microfiltration of microalgae containing medium.

Parameters	After acid sedimentation / before biological treatment	After microalgae cultivation and microfiltration
pH	6.03	9.24
COD (mg L ⁻¹)	1482 ± 415	97 ± 27
DBO ₅ (mg L ⁻¹)	1136 ± 216	41 ± 8
TOC (mg L ⁻¹)	511 ± 153	29 ± 9
TSS (mg L ⁻¹)	77 ± 22	8 ± 2
Total N	122 ± 7	48 ± 3
Nitrate (as N) (mg L ⁻¹)	< 0.014	< 0.014
Nitrite (as N) (mg L ⁻¹)	< 0.002	< 0.002
Total phosphorous (mg L ⁻¹)	19 ± 2	2 ± 0.2
Turbidity (NTU)	98 ± 8	6 ± 0.4

The reported value corresponds to average of triplicates experiments ± standard deviation.

pore size) or used from the beginning, disinfection, and pH adjustment (they will be evaluated in future experiments).

Based on the obtained results, a new process for PSW treatment was proposed (Fig. 4). The PSW is collected in a tank and is submitted to acid precipitation by adding sulfuric acid until pH 4, the supernatant is separate and set at pH 6, only for microalgae cultivation in batch process, and then the wastewater (pH 4) can be directly fed into the bioreactor in a continuous stage, allowing to control the pH of the medium at < 9. Moreover, according to the results showed in Fig. 2A, the pH of PSW not necessarily needs to be reduced at pH 4, it is possible to

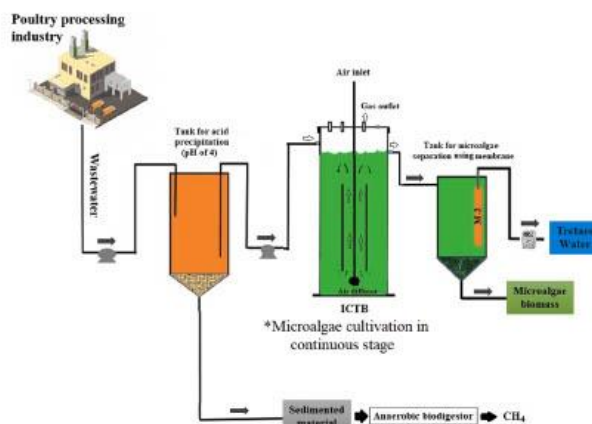


Fig. 4. Proposed process based on acid precipitation and microalgae cultivation for PSW treatment. In the figure "M-2" corresponds to ultrafiltration membrane module.

work at a pH between 4 and 5. These strategies reduce the consumption of acid and alkalis in the process. Finally, the proposed strategies are efficient to mitigate the PSW negative impact on environment, mainly in developing countries like Peru. On the other hand, the use of PSW as a substrate for microalgae cultivation is a suitable option, once the obtained biomass can be valorized in bioenergy production (e.g., biodiesel or bioethanol) or biofertilizer and the sedimented material can be used to produce methane in an anaerobic bioreactor.

4. Conclusion

A new method was developed based on acid precipitation and subsequent microalgae cultivation. This proposed method allows 80% COD removal in the first step and more than 83% of residual COD removal in the second step (microalgae cultivation). Additionally, the process was successfully performed in batch and continuous processes with efficient removal of organic matter and nutrients. After the microfiltration process for microalgae separation, it is suggested to include ultra or micro filtration processes, aiming to reuse the water to a zero-discharge process. On overall, more studies are suggested aiming to evaluate the process from economic and environmental viewpoints.

CRediT authorship contribution statement

Ruly Terán Hílares: Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing. Klara A. García Bustos: Investigation, Data curation, Conceptualization. Fabio P. Sanchez Vera: Investigation, Validation. Gilberto J. Collina Andrade: Validation, Writing - review & editing. David A. Pacheco Tanaka: Validation, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

This study was supported by the Consejo Nacional de Ciencia,

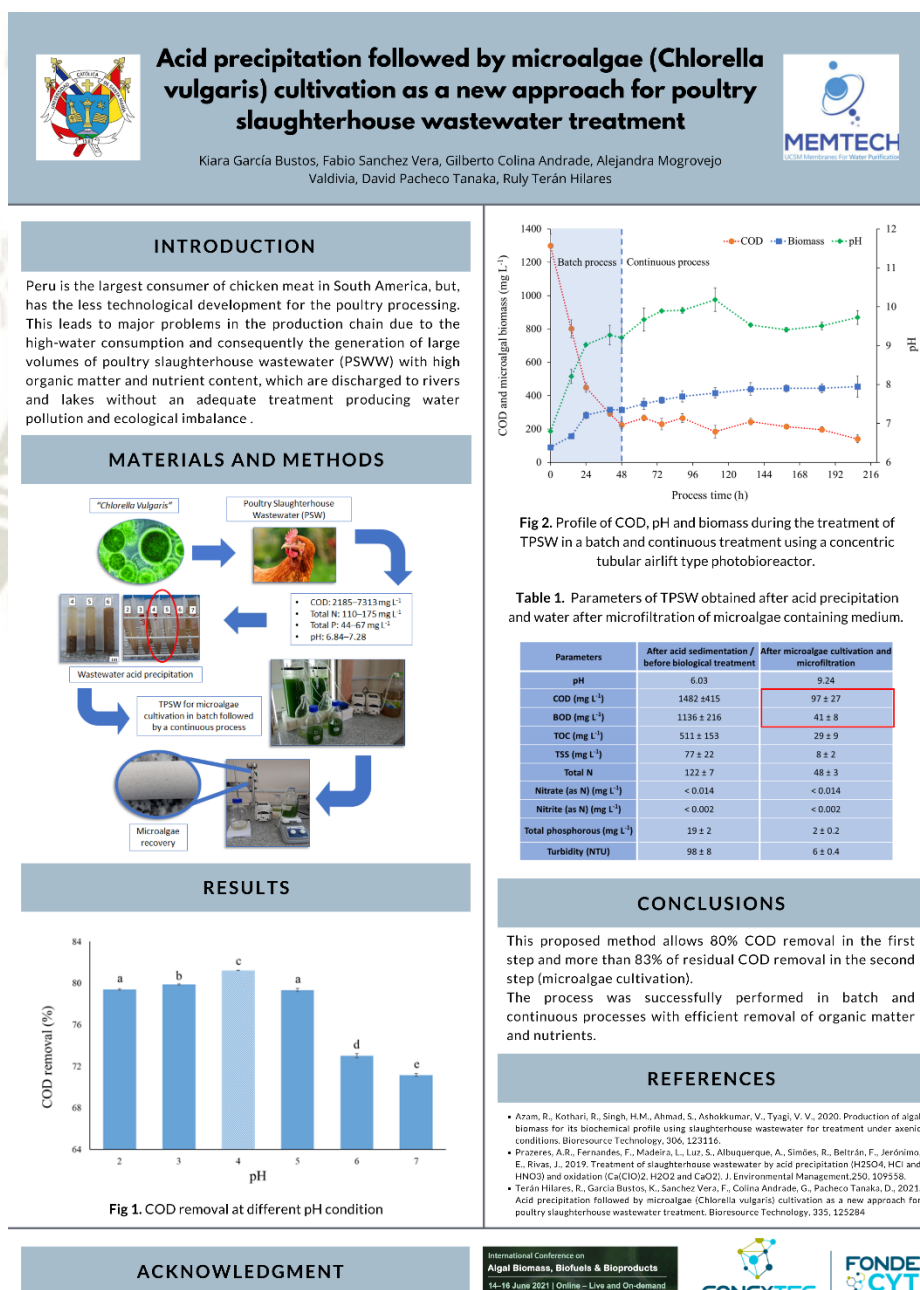
Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) and the Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) - Perú. Grant N° 06-2019-FONDECYT-BM-INC. INV.

References

- Adou, K.E., Alle, O.A., Kouakou, A.R., Adouby, K., Drogui, P., Tyagi, R.D., 2020. Anaerobic mono-digestion of wastewater from the main slaughterhouse in Yamoussoukro (Côte d'Ivoire): Evaluation of biogas potential and removal of organic pollution. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 8 (3), 103770. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.103770>.
- Agüera, A., Plaza-Bolaños, P., Fernández, F.G.A., 2020. In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, pp. 503–525. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819594-9.00020-6>.
- Álvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., Bernardo, A., López, M., 2010. Acid tolerance in *Salmonella typhimurium* induced by culturing in the presence of organic acids at different growth temperatures. *Food Microbiology* 27 (1), 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.07.015>.
- AOAC (1964). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*.
- APHA, 2005. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 21th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- ASTM D9921 (2011). *Standard Test Method for Oil and Grease and Petroleum Hydrocarbons in Water*.
- Avula, R.Y., Nelson, H.M., Singh, R.K., 2009. Recycling of poultry process wastewater by ultrafiltration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 10 (1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.08.005>.
- Azam, R., Kothari, R., Singh, H.M., Ahmad, S., Ashokkumar, V., Tyagi, V.V., 2020. Production of algal biomass for its biochemical profile using slaughterhouse wastewater for treatment under axenic conditions. *Bioresour. Technol.* 306, 123116. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123116>.
- BARROS, L.S.S., AMARAL, L.A., LORENZON, C.S., JUNIOR, J.L., NETO, J.G.MACHADO, 2007. Potential microbiological contamination of effluents in poultry and swine abattoirs. *Epidemiol. Infect.* 135 (3), 505–518. <https://doi.org/10.1017/S0950268806006972>.
- Basitere, M., Njoya, M., Rinquest, Z., Ntwampe, S.K.O., Sheldon, M.S., 2019. Performance evaluation and kinetic parameter analysis for static granular bed reactor (SGBR) for treating poultry slaughterhouse wastewater at mesophilic condition. *Water Pract. Technol.* 14, 259–268.
- Bayar, S., Yildiz, Y., Yilmaz, A.E., Irdemez, S., 2011. The effect of stirring speed and current density on removal efficiency of poultry slaughterhouse wastewater by electrocoagulation method. *Desalination* 280 (1–3), 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.06.061>.
- Chávez, P.C., Castillo, L., Dendooven, L.R., Escamilla-Silva, E.M., 2005. Poultry slaughter wastewater treatment with an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *Bioresour. Technol.* 96 (15), 1730–1736. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.08.017>.
- Dassey, A.J., Theegala, C.S., 2012. Evaluating coagulation pretreatment on poultry processing wastewater for dissolved air flotation. *Journal of Environmental Science*

- and Health, Part A 47 (13), 2069–2076. <https://doi.org/10.1080/10944529.2012.695946>.
- Davarnejad, R., Nasiri, S., 2017. Slaughterhouse wastewater treatment using an advanced oxidation process: Optimization study. *Environmental Pollution* 223, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.008>.
- Del Nery, V., de Nardi, L.R., Damjanovic, M.H.R.Z., Pozzi, E., Amorim, A.K.B., Zaiat, M., 2007. Long-term operating performance of a poultry slaughterhouse wastewater treatment plant. *Resources, Conservation and Recycling* 50 (1), 102–114. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2006.06.001>.
- DS Nº015-2015-MINAM. National Environmental Quality Standards for Water and establish complementary provisions for their application. Ministry of Environment, Peru. 2015.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nation, 2020. Food Outlook BIENNIAL REPORT ON GLOBAL FOOD MARKETS. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9509en>.
- Pérez, L., Gokovic, Z., Muñoz, R., Punk, C., 2019. Growth performance and nutrient removal of a *Chlorella vulgaris*-Rhizobium sp. co-culture during mixotrophic feed-batch cultivation in synthetic wastewater. *Algal Research* 44, 101690. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101690>.
- Garg, A., Mishra, I.M., Chand, S., 2010. Effectiveness of coagulation and acid precipitation processes for the pre-treatment of diluted black liquor. *Journal of Hazardous Materials* 180 (1–3), 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.04.006>.
- Goewami, K.P., Pugazhenth, G., 2020. Treatment of poultry slaughterhouse wastewater using tubular microfiltration membrane with fly ash as key precursor. *Journal of Water Process Engineering* 37, 101361. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101361>.
- Gutiérrez, M.A., 2019. Poultry farming in Peru continues to grow this year 2019. [WWW Document]. URL <https://avicultura.info/avicultura-de-peru-continua-crecer-este-ano-2019/> (accessed 3.7.21).
- Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., Solana, M., Bertucco, A., García-González, M.C., 2016. Microalgae cultivation in high rate algal ponds using slaughterhouse wastewater for biofuel applications. *Chemical Engineering Journal* 285, 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.09.072>.
- Hussain, F., Shah, S.Z., Ahmad, H., Abubshait, S.A., Abubshait, H.A., Laref, A., Manikandan, A., Kusuma, H.S., Iqbal, M., 2021. Microalgae an ecofriendly and sustainable wastewater treatment option: Biomass application in biofuel and bio-fertilizer production. A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 137, 110603. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110603>.
- Keerthirathne, T.P., Rosa, K., Fallowfield, H., Whitley, H., 2016. A review of temperature, pH, and other factors that influence the survival of *Salmonella* in mayonnaise and other raw egg products. *Pathogens* 5 (4), 63. <https://doi.org/10.3390/pathogens5040063>.
- Krupińska, I., 2020. Aluminium drinking water treatment residuals and their toxic impact on human health. *Molecules* 25 (3), 641. <https://doi.org/10.3390/molecules25030641>.
- Kumar, V., Othman, N., Asharuddin, S., Zainorizuan, M.J., Yee Yong, L., Alvin John Meng Siang, L., Mohammad Haniff, O., Siti Nazahyah, R., Mohd Shalahuddin, A., 2017. Applications of Natural Coagulants to Treat Wastewater – A Review. *MATEC Web Conf.* 103, 06016. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201710306016>.
- Lo, Y.M., Cao, D., Argin-Soydal, S., Wang, J., Hahn, T.S., 2005. Recovery of protein from poultry processing wastewater using membrane ultrafiltration. *Bioresour. Technol.* 96, 687–698.
- Maroneze, M.M., Barin, J.S., Menezes, C.R.D., Queiroz, M.I., Zepka, L.Q., Jacob-Lopes, E., 2014. Treatment of cattle-slaughterhouse wastewater and the reuse of sludge for biodiesel production by microalgal heterotrophic bioreactors. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)* 71 (6), 521–524. <https://doi.org/10.1590/S0103-9016-2014-0092>.
- Nagarajan, D., Kusmayadi, A., Yen, H.-W., Dong, C.-D., Lee, D.-J., Chang, J.-S., 2019. Current advances in biological swine wastewater treatment using microalgae-based processes. *Bioresour. Technol.* 289, 121718. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121718>.
- NTP 209.265 (2001). Ash determination Gravimetric Method. INDECOPI. Peruvian Technical Standard. Lima Peru. https://servicios.inacal.gob.pe/programa_actualizacion/ProgramaActualizacion.aspx?anio=2018.
- NTP 209.263 (2001). Determination of fat Gravimetric Method. In INDECOPI. Peruvian Technical Standard. Lima Peru. https://servicios.inacal.gob.pe/programa_actualizacion/ProgramaActualizacion.aspx?anio=2018.
- Otondo, Alessandra, Kokabian, Bahareh, Stuart-Duhal, Savannah, Gude, Veera Gnaneswar, 2018. Energetic evaluation of wastewater treatment using microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6 (2), 3213–3222. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.04.064>.
- Park, J.B.K., Craggs, R.J., Shilton, A.N., 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresour. Technol.* 102 (1), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.158>.
- Paulista, Larissa Oliveira, Presumido, Pedro Henrique, Theodoro, Joseane Debona Perugo, Pinheiro, Alexei Lorenzetti Novaes, 2018. Efficiency analysis of the electrocoagulation and electroflotation treatment of poultry slaughterhouse wastewater using aluminum and graphite anodes. *Environ Sci Pollut Res* 25 (20), 19790–19800. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2184-y>.
- Pozadas, E., Alcántara, C., García-Encina, P.A., Gouveia, L., Guieysse, B., Norvill, Z., Acien, F.G., Markou, G., Congestri, R., Koreiviene, J., Muñoz, R., 2017. In: *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*. Elsevier, pp. 67–91. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00003-0>.
- Potrich, M.C., Duarte, E. de S.A., Sikora, M. de S., Costa da Rocha, R.D., 2020. Electrocoagulation for nutrients removal in the slaughterhouse wastewater: comparison between iron and aluminum electrodes treatment. *Environ. Technol.* 1–15.
- Praseres, Ana R., Fernandes, Flávia, Madeira, Luis, Luz, Silvana, Albuquerque, Antônia, Simões, Rogério, Beltrán, Fernando, Jerônimo, Eliana, Rivas, Javier, 2019. Treatment of slaughterhouse wastewater by acid precipitation (H2SO4, HCl and HNO3) and oxidation (Ca(ClO)2, H2O2 and CaO). *Journal of Environmental Management* 250, 109558. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109558>.
- Rattanapan, Cheerawit, Sawain, Aneak, Sukasroj, Thunwadee, Sukasroj, Chairri, 2011. Enhanced efficiency of dissolved air flotation for biodegradable wastewater treatment by acidification and coagulation processes. *Desalination* 280 (1–3), 370–377. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.07.018>.
- Ruiz, I., Veiga, M.C., de Santiago, P., Blázquez, R., 1997. Treatment of slaughterhouse wastewater in a UASB reactor and an anaerobic filter. *Bioresour. Technol.* 60 (3), 251–258. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00020-5).
- Saravanan, A., Kumar, P., Senthil, Varjani, Sunita, Jeevanantham, S., Yaashikaa, P.R., Thamara, P., Abirami, B., George, Cynthia Susan, 2021. A review on algal-bacterial symbiotic system for effective treatment of wastewater. *Chemosphere* 271, 129540. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129540>.
- Salgueiro, Jose Luis, Pérez, Leticia, Macieiras, Rocio, Sánchez, Ángel, Canela, Ángeles, 2018. Semi-continuous Culture of *Chlorella vulgaris* Microalgae for Wastewater Treatment. *Int J Environ Res* 12 (6), 765–772. <https://doi.org/10.1007/s41742-018-0129-4>.
- Struk-Sokolowska, J., Thaczak, J., 2018. Analysis of Bakery Sewage Treatment Process Options Based on COD Fraction Changes. *Journal of Ecological Engineering* 19 (4), 226–235. <https://doi.org/10.12911/22998993/89655>.
- Song, Chunfeng, Qiu, Yiting, Xie, Meilian, Qi, Yun, Li, Shuhong, Kitamura, Yutaka, 2019. Novel Bio-regeneration Concept via Using Rich Solution as Nutrition Resource for Microalgae Cultivation: Effect of pH and Feeding Modes. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 7 (17), 14471–14478. <https://doi.org/10.1021/acscchemeng.9b01839>.
- Tagliaferro, Geronimo Virginio, Filho, Hélio José Izário, Chandel, Anuj Kumar, da Silva, Silvio Silvério, Silva, Mesias Borges, dos Santos, Jélio César, 2019. Continuous cultivation of *Chlorella minutissima* 26a in landfill leachate-based medium using concentric tube airlift photobioreactor. *Algal Research* 41, 101549. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101549>.
- Teh, C.Y., Budiman, P.M., Shak, K.P.Y., Wu, T.Y., 2016. Recent Advancement of Coagulation-Flocculation and Its Application in Wastewater Treatment. *Ind. Eng. Chem. Res.* 55 (16), 4363–4389. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b04703>.
- Terán Hílares, Ruly, Atoche-Garay, Diego F., Pinto Pagaza, Daniel A., Ahmed, Muhammad Aja, Colina Andrade, Gilberto J., Santos, Jélio César, 2021. Promising physicochemical technologies for poultry slaughterhouse wastewater treatment: A critical review. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 9 (2), 105174. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105174>.
- Tucker, C.S., Abramo, L.R.D., 2008. Managing High pH in Freshwater Ponds. *South. Reg. Aquac. Cent.* 46, 1–3.
- Yusoff, M.S., Arwan, A.M., Zamri, M.F.M.A., Aziz, H.A., 2017. Removal of colour, turbidity, oil and grease for slaughterhouse wastewater using electrocoagulation method. In: *AIP Conference Proceedings*. American Institute of Physics Inc., p. 040012. <https://doi.org/10.1063/1.5005692>.
- Zhang, Jingdong, Zhang, Pang, Luo, Yuhong, Yang, Hong, 2006. A preliminary study on cactus as coagulant in water treatment. *Process Biochemistry* 41 (3), 730–733. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.08.016>.

ANEXO 2: Presentación del poster “Acid precipitation followed by microalgae (*Chlorella vulgaris*) cultivation as a new approach for poultry slaughterhouse wastewater treatment” en “10th Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts Conference: Online” organizado por ELSEVIER



International Conference on
Algal Biomass, Biofuels & Bioproducts
14–16 June 2021

ONLINE
LIVE &
ON-DEMAND

Certificate of Presentation

We hereby confirm that

Kiara García Bustos

Presented

Acid precipitation followed by microalgae (*Chlorella vulgaris*) cultivation as a new approach for poultry slaughterhouse wastewater treatment

At the International Conference on Algal Biomass, Biofuels & Bioproducts
14 – 16 June 2021, Online



Charlotte Alman
For and on behalf of Elsevier Ltd

